IST DIE ÖSTROGEN-CHOLESTASE FOLGE EINER ERHÖHTEN PERMEABILITÄT DES PARAZELLULÄREN WEGES?

Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hartmut Jäschke
aus Stuttgart

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0109

IST DIE ÖSTROGEN-CHOLESTASE FOLGE EINER ERHÖHTEN PERMEABILITÄT DES PARAZELLULÄREN WEGES?

Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hartmut Jäschke
aus Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 9.8.1983

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Pfaff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Wendel

A B S T R A C T

Jäschke, Hartmut:

Ist die Östrogen-Cholestase Folge einer erhöhten Permeabilität des parazellulären Weges? - Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber.

Die Östrogen-induzierte intrahepatische Cholestase wurde am Modell der Hämoglobin-frei isoliert perfundierten Rattenleber insbesondere im Hinblick auf Permeabilitätsänderungen des parazellulären Weges untersucht. Ethinylöstradiol [5 mg/(kg x Tag), 5 Tage]verursachte am narkotisierten Tier wie an der isolierten Leber eine Erniedrigung des Gallenflusses um 50 % sowie eine Sekretionshemmung für Taurocholat (TC), bei gleichzeitig erhöhter Konzentration von TC in der Galle. Die biliäre Clearance inerter Moleküle (Sucrose, Inulin) war mit denen der Kontrollen nahezu identisch. Der direkte Vergleich mit der α-Naphthylisothiocyanat-(ANIT)-Cholestase zeigte substanzielle Unterschiede: Der basale Gallenfluß war um 30 %, der TC-stimulierte um 55 % erniedrigt; die signifikante Zunahme der biliären Sucrose- und Inulin-Clearance sowie die abnehmende Fähigkeit TC in der Galle zu konzentrieren und dessen vermehrtes Erscheinen im Perfusat bestätigten den erleichterten parazellulären Reflux von Gallenbestandteilen bei ANIT. Der Vergleich mit diesen Befunden schloß eine Permeabilitätserhöhung der "tight junctions" als Ursache der Östrogen-Cholestase aus.
Eine Langzeitbehandlung mit dem Depotöstrogen Östradiolvalerat (EV) [1 mg/(kg x Woche)] führte zu einer moderaten Cholestase während der gesamten Behandlungsdauer (1 - 20 Wochen). Im Gegensatz dazu waren die Sekretionsparameter erst nach 3 Wochen signifikant erniedrigt bzw. die biliäre Sucrose-Clearance erhöht, ohne weitere Änderung bei Fortsetzung der Behandlung bis 20 Wochen. Damit war erstmals für ein Cholestatikum gezeigt, daß eine Permeabilitätserhöhung der "tight junctions" eine Sekundärschädigung der Leber durch die Cholestase darstellt und keine direkte Wirkung der Östrogene.

An der isoliert perfundierten Leber wurde eine Methode erarbeitet, mit der erstmals der Nachweis der gleichzeitigen Beteiligung trans- und parazellulärer Wege beim Einstrom inerter Moleküle (z.B. Sucrose) in die Galle gelang und die zusätzlich eine quantitative Abschätzung beider Wege ermöglichte. Unter basalen Bedingungen kamen 16 % der Sucrose über die Zelle, 84 % jedoch parazellulär in die Galle. Die erhöhte biliäre Sucrose-Clearance bei Cholestatika (ANIT, EV) war ausschließlich auf den verstärkten parazellulären Einstrom zurückzuführen. Die transzellulär transportierte Sucrose-Menge wurde dabei nicht verändert.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

- Jaeschke H, Krell H, Pfaff E. (1983)
  No increase of biliary permeability in ethinylestradiol treated rats.
  Gastroenterology 85: in press

- Jaeschke H, Krell H. (1983)
  Permeabilität der "tight junctions" bei Östrogen-Cholestase
  Hoppe-Seylers Z Physiol Chem 364: 343 (Abstr.)

- Jaeschke H, Krell H. (1983)
  No increase of biliary permeability in ethinylestradiol treated rats.
  Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol Suppl. 322: R 55 (Abstr.)

- Jaeschke H, Krell H. (1983)
  Biliary permeability in estrogen-treated rats
  Falk Symposium 39 (Hepatologie) Wien (Abstr.)

Die vorliegende Dissertation wurde von August 1981 bis Juni 1983 am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H. Remmer) unter Anleitung von Prof. Dr. E. Pfaff durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. E. Pfaff und Herrn Dr. H. Krell danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die mir jederzeit erwiesene großzügige Förderung.

Frau S. Kasperek und Herrn cand. biochem. G. Bauer danke ich für exzellente technische Hilfeleistungen, und Herrn W. Schneck für die sorgfältige Betreuung meiner Versuchstiere.

Mein besonderer Dank für seine fachkundige Assistenz bei zahlreichen Tierversuchen sowie für die hervorragende Zusammenarbeit der letzten Jahre gilt Herrn Diplombiochemiker G. Blaich.

A naturalist's life would be a happy one
if he had only to observe
and never to write

Charles Darwin

A B K Ü R Z U N G E N

ANIT	α-Naphthylisothiocyanat
ATP	Adenosintriphosphat
BSP	Sulfobromophthalein
BSP·SG	Glutathionkonjugat von BSP
EE	17ß-Ethinylöstradiol
EV	Östradiol-17ß-valerat
GF	Gallenfluß
G6PDH	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
GSH	reduziertes Glutathion
h	Stunde
ID	Innendurchmesser
K	Diffusions-Permeabilitätskoeffizient
KG	Körpergewicht
K_m	Michaelis-Konstante
LDH	Lactatdehydrogenase
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert)
Na^+, K^+-ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
SD	Standardabweichung
ϑ	Reflektionsfaktor
TC	Taurocholat

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Mechanismus der Gallensekretion	1
1.1.1.	Einzelschritte der Gallebildung	2
1.1.2.	Der parazelluläre Weg	5
1.2.	Mechanismus der Östrogen-Cholestase	7
2.	ZIEL DER ARBEIT	9
3.	MATERIALIEN UND METHODEN	10
3.1.	Materialien	10
3.1.1.	Chemikalien	10
3.1.2.	Radiochemikalien	10
3.1.3.	Versuchstiere	10
3.2.	Methoden	11
3.2.1.	Vorbehandlung der Versuchstiere	11
3.2.2.	Gallenfistel-Ratten	11
3.2.3.	Leberperfusionstechnik	12
3.2.4.	Versuchsanordnungen	14
3.2.4.1.	Experimente zur Perfusionsmethode	14
3.2.4.2.	Experimente zur Östrogen-Cholestase	14
3.2.4.3.	Experimente zum parazellulären Weg	16
3.2.5.	Enzym- und Metabolitbestimmungen	16
3.2.6.	Radioaktivitätszählung	16

3.2.7.	Bestimmung von TC und BSP	17
3.2.8.	Trennung von BSP und BSP·SG im Perfusat	17
3.2.9.	Dünnschichtchromatographische Trennung der BSP-Metabolite in der Galle	17
3.2.10.	Statistische Methoden	18
4.	ERGEBNISSE	19
4.1.	Untersuchungen zur Leberperfusionsmethode	19
4.1.1.	Gallenfluß und LDH-Efflux der isoliert perfundierten Rattenleber	19
4.1.2.	Metabolismus im offenen und rezirkulierenden Perfusionssystem	21
4.1.3.	Taurocholatsekretion der isoliert perfundierten Rattenleber	25
4.1.4.	Permeabilität der "tight junctions"	26
4.2.	Untersuchungen zur Östrogen-Cholestase	27
4.2.1.	Die Ethinylöstradiol-induzierte Cholestase	27
4.2.1.1.	Effekte der Ethinylöstradiol-Behandlung auf das Leber- und Körpergewicht	27
4.2.1.2.	Gallenfluß und Taurocholatsekretion	29
4.2.1.3.	Galle/Perfusat-Verhältnisse und Clearance-Raten von Sucrose und Inulin	31
4.2.2.	Die Östradiolvalerat-induzierte Cholestase	36
4.2.2.1.	Abhängigkeit des Gallenflusses und der Taurocholatsekretion von der Behandlungsdauer	36
4.2.2.2.	Abhängigkeit der Sucrose-Clearance von der Behandlungsdauer	37

4.2.2.3. Parazellulärer Reflux von konjugiertem BSP 39

4.3. Der parazelluläre Weg 42

4.3.1. Der zeitliche Verlauf der biliären und intrazellulären Sucrose-Konzentration 42

4.3.2. Der transzelluläre Transport der Sucrose 45

5. DISKUSSION 50

5.1. Leberperfusionsmethode 50

5.2. Die Östrogen-Cholestase 52

5.2.1. Die Ethinylöstradiol-induzierte Cholestase 52

5.2.2. Die Östradiolvalerat-induzierte Cholestase 53

5.3. Der parazelluläre Weg 56

6. LITERATUR 59

L E B E N S L A U F 66

1. EINLEITUNG

1.1. Mechanismus der Gallensekretion

Der gerichtete Transport der Gallensekretion der Leber hat als Grundvoraussetzung eine bereits im Aufbau des einzelnen Hepatozyten manifestierte Polarität. An der Plasmamembran wird diese sowohl strukturell im elektronenmikroskopischen Dünnschnittpräparat als auch funktionell durch unterschiedlichen Enzymbesatz deutlich (1):

A. Der basale oder sinusoidale Teil der Zelle, dessen Oberfläche durch Microvilli stark vergrößert ist, ermöglicht die effektive Aufnahme von Substanzen aus dem Portalblut.

B. Die glatte laterale Zellmembran begrenzt den Interzellularspalt.

C. Die apikale Membran bildet den Gallencanaliculus. Obwohl dieser Teil nur 13 % der Gesamtoberfläche des Hepatozyten ausmacht (2), so müssen doch alle Gallensekretionsprodukte der Leberzelle über diese Membran transportiert werden. Das Lumen des Canaliculus wird durch die Zonula occludens ("tight junctions") zweier benachbarter Hepatocyten von der Blutseite getrennt.

Als Folge der suprazellulären Organisation der Leber und ihrer Unterheiten sind nicht alle Hepatozyten in gleicher Weise an der Gallebildung beteiligt; so ist die Rolle eines Hepatozyts bei der Gallensekretion abhängig von seiner Lage innerhalb des Leberacinus (3). Zellen, die im Bereich der Acinus Zone 1 (periportal) mit den höchsten Konzentrationen an Gallensäuren konfrontiert werden, transportieren diese bevorzugt und bilden damit vor allem den Gallensäure-abhängigen Fluß. Im Gegensatz dazu bilden die Hepatozyten der Acinus Zone 3, an denen unter physiologischen Bedingungen weitgehend gallensäurefreies Blut vorbeifließt,

den Gallensäure-unabhängigen Fluß. Während neuere Studien an der isoliert perfundierten Rattenleber zeigten (4,5), daß bezüglich der Aufnahmekapazität für Gallensäuren zwischen den Zellen von Zone 1 und Zone 3 kein Unterschied besteht, so ist doch die Sekretionskapazität der Zellen in Zone 1 erheblich größer. Die unterschiedliche Beteiligung der Hepatozyten bei der Gallebildung ist damit nicht nur Folge der Lokalisierung der Zelle im Acinus, sondern auch auf konstitutive Unterschiede zurückzuführen.

1.1.1. Einzelschritte der Gallebildung

Der komplexe Vorgang der Gallensekretion läßt sich in einzelne Teilschritte gliedern, die in Abhängigkeit von den verfügbaren Methoden mehr oder weniger gut verstanden werden. Im folgenden Kapitel soll versucht werden die gesicherten Tatsachen und kontrovers diskutierten Probleme dieser Teilschritte aufzuzeigen. Der erste Schritt bei der Gallebildung besteht aus der Aufnahme von Gallensäuren in die Leberzelle entgegen einem elektrochemischen Gradienten. Ergebnisse an isolierten Hepatozyten (6), kultivierten Hepatozyten (7,8) und der isoliert perfundierten Rattenleber (9) zeigten übereinstimmend die Aufnahme von Gallensäuren durch einen sättigbaren Na^+-Cotransport, der eine Selektivität für hydrophilere Gallensäuren (Cholsäure, Taurocholsäure, Glycocholsäure) besitzt: K_m-Werte für Trihydroxy-$\leq$ konjugierte Dihydroxy-<Di- und Monohydroxy-Gallensäuren (7,10). Lipophile Gallensäuren (Chenodesoxycholsäure, Desoxycholsäure, Lithocholsäure) werden bevorzugt durch einen nichtsättigbaren, Na^+-unabhängigen Mechanismus aufgenommen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um einfache Diffusion, da diese Aufnahmeraten mit dem Dekan-Wasser-Verteilungskoeffizienten korrelieren und von der Struktur der Gallensäure abhängen (7). Bei physiologischen Gallensäurekonzentrationen in der Pfortader von 5 - 60 µM (7,10) spielt dieser Na^+-unabhängige Aufnahmemechanismus nur eine unter-

geordnete Rolle.

Weit weniger bekannt ist der 2. Schritt der Gallebildung, der transzelluläre Transport der Gallensäuren. Diskutiert wird die Bindung an ein nicht näher charakterisiertes cytosolischen Protein (11) sowie ein vesikulärer Transport. Die letztere Vermutung stützt sich auf die Beobachtung, daß nach intraduodenaler Infusion von Gallensäuren bei Ratten das Volumen des Golgiapparates einerseits, sowie die Zahl von großen Vesikeln in der unmittelbaren Umgebung des Gallencanaliculus andererseits, stark zunehmen (12). Autoradiographische Studien bestätigten diese Befunde insofern, als sie 300 sec nach intravenöser Injektion von markierten Gallensäuren die Hauptmenge der Radioaktivität im Bereich des ER, des Golgiapparates und in der Nähe der canaliculären Membran wiederfanden (13). Die Zellfraktionierung brachte den Nachweis der intraluminalen Lokalisierung der Gallensäuren im glatten ER. Damit ist auch für Gallensäuren ein transzellulärer Transport in Vesikeln, wie für Proteine bereits gezeigt (14) und seit kurzem auch für kleine, inerte Moleküle postuliert (15,16), wahrscheinlich geworden.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Lebertransports ist für unkonjugierte Gallensäuren und die meisten Fremdstoffe die Konjugation am glatten Endoplasmatischen Reticulum. Für den Großteil der Gallensäuren, die sich in konjugierter Form im enterohepatischen Kreislauf befinden, ist die canaliculäre Sekretion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Für diesen Vorgang, der bis jetzt experimentell direkt noch nicht zugänglich ist, werden verschiedene Mechanismen diskutiert. So könnte das Membranpotential (~-40 meV) die Energie für die Ausschleusung der Anionen liefern (2). Die Proteinbindung oder der Einschluß in Vesikel stellen jedoch eine Verteilung nach dem Membranpotential in Frage. Weitere Möglichkeiten, wie Exozytose oder aktiver Transport, konnten experimentell noch nicht nachgewiesen werden. Die in den Canaliculus sezernierten Gallensäuren bilden einen osmotischen Gradienten, der den Ein-

strom von Wasser und Elektrolyten nach sich zieht (= Gallensäure-abhängiger Fluß).

Dem eben beschriebenen Gallensäure-abhängigen Fluß wird seit geraumer Zeit ein Gallensäure-unabhängiger Fluß gegenübergestellt. Dieser Begriff entstand ursprünglich durch die Beobachtung, daß eine lineare Beziehung zwischen dem Gallenfluß und der Gallensäuresekretionsrate besteht, die bei der Extrapolation gegen Null die Fluß-Achse positiv schneidet (17). Dieser Abschnitt, so wurde angenommen, repräsentiert den Teil des Gallenflusses, der bei Abwesenheit von Gallensäuren gebildet wird. Dabei sollte es sich um einen durch die Na^+, K^+-ATPase erzeugten aktiven Elektrolytfluß über die canaliculäre Membran handeln (18). Diese Vorstellungen mußten inzwischen vollkommen revidiert werden:

1. Die lineare Extrapolation auf die Gallensäurekonzentration Null ist nicht richtig (19,20), da u. a. wegen der Möglichkeit der Mizellenbildung die osmotischen Aktivität von Gallensäuren von ihrer Konzentration abhängig ist.
2. Die Na^+, K^+-ATPase wurde in den baso-lateralen Bereichen der Hepatozytenmembran, aber nicht auf der apikalen Seite gefunden (21,22).
3. Die Aktivität der Na^+, K^+-ATPase beeinflußt sowohl den Gallensäure-abhängigen wie auch den Gallensäure-unabhängigen Fluß (2,23,24), so daß Erlinger zu Recht diese Unterteilung des Gallenflusses in Frage stellt (24).

Die derzeitigen Vorstellungen über die Mechanismen des Gallensäure-unabhängigen Flusses umfassen einen aktiven Na^+-Transport in den Interzellularspalt, mit anschließendem passiven Einstrom des Na^+ über die "tight junctions" in die Galle (24) sowie den transzellulären Transport von Anionen (Cl^-, HCO_3^-). Die Rolle des Na^+-abhängigen Cl^--Transports ist umstritten. Van Dyke et al. sieht in diesem Mechanismus keinen Beitrag zum Gallensäure-unabhängigen

Fluß (25), während Anwer und Hegner dem Cl^--Transport bei der Stimulierung dieses Flusses (z.B. durch cAMP) eine größere Bedeutung beimessen (26). In Übereinstimmung mit Hardison und Wood (27) wird dem HCO_3^--Transport der Hauptanteil am Gallensäure-unabhängigen Fluß zugestanden (25,26). Zwei Mechanismen werden diskutiert:

1. Ein Na^+/H^+-Austausch, der durch den Na^+-Gradienten der Na^+, K^+-ATPase betrieben wird (28,29) oder
2. eine primäre $H^+(HCO_3^-)$-Pumpe (30,31).

Graf (16) stellt die Sekretion anorganischer Anionen als Ursache des Gallensäure-unabhängigen Flusses überhaupt in Frage. Er postuliert eine kontinuierliche Sekretion noch nicht identifizierter organischer Anionen in den Canaliculus, deren Rückfluß über den parazellulären Weg aufgrund ihrer Größe und Ladung beschränkt ist. Wasser- und Elektrolytbewegungen resultieren nur aus den osmotischen Effekten organischer Anionen, der Diffusion und dem "solvent drag".

1.1.2. Der parazelluläre Weg

Bei der Gallebildung handelt es sich um eine iso-osmotische Sekretion. Die meisten epithelialen Gewebe, die isotone Flüssigkeiten sezernieren, äquilibrieren über parazelluläre Wege (32). In Analogie dazu sollten Gallensäuren und andere osmotisch aktive Substanzen sowohl einen trans- wie auch parazellulären Wasser- und Elektrolytfluß nach sich ziehen. Vom Verhältnis Oberfläche zu Volumen her ist zu vermuten, daß die Einstellung des osmotischen Gleichgewichts auf der Ebene des Canaliculus stattfindet, da dieses Verhältnis vom Canaliculus zum Gallengang sehr stark abfällt (18). Der cholestatische Effekt von hyperosmolaren Lösungen besteht in einer schnellen osmotischen Äquilibrierung mit dem Plasma (2,35).
Es gibt eine Reihe indirekter Hinweise auf den Eintritt von Wasser und Elektrolyten in die Galle über den parazellulä-

ren Weg. So werden bei der Stimulierung des Gallenflusses durch Dehydrocholsäure Membranveränderungen im Interzellularspalt elektronenmikroskopisch sichtbar. Gleichzeitig kommt es zu einer Permeabilitätserhöhung der "tight junctions" (33,34). Diese Ergebnisse zeigen, daß eine osmotische Cholerese den parazellulären Eintritt von Wasser und Elektrolyten stimulieren kann. An der isoliert perfundierten Rattenleber schätzten Graf und Peterlik die parazellulären Anteile von Na^+ auf 95 %, von K^+ auf 74 % und von Cl^- auf 73 % (35). Ferner gibt es Hinweise, daß die "tight junctions" negativ geladen sind (36) und deshalb den Rückfluß von Gallensäuren und anderen Anionen verhindern, jedoch andererseits den Eintritt von kleinen positiv geladenen Ionen (Na^+, K^+) begünstigen. Nicht metabolisierbare Substanzen wie Sucrose oder Inulin könnten ebenfalls über den parazellulären Weg in die Galle gelangen (33,37-39), obwohl sie auch langsam intrazellulär äquilibrieren. Die Gleichgewichtskonzentration in der Galle wird jedoch vor der in der Leberzelle erreicht, was mit einem schnellen, bevorzugt parazellulären Ausgleich interpretiert wurde (37). Obwohl ein schnellaustauschbarer intrazellulärer Pool (z.B. ein vesikulärer Pool) nicht ausgeschlossen werden konnte, war doch die vorherrschende Meinung in den siebziger Jahren, daß diese inerte Substanzen vorwiegend parazellulär in die Galle kommen (2,40). Seit 1982 wird jedoch auch zunehmend wieder ein transzellulärer Vesikeltransport diskutiert (15,16,41) und ein parazellulärer Transport in Frage gestellt (16). Ergebnisse dieser Dissertation zeigen am Beispiel der Sucrose, daß sowohl trans- wie auch parazellulärer Weg an der Clearance von Sucrose beteiligt sind und liefert erstmals eine quantitative Abschätzung des Transportbeitrags dieser beiden Wege.

1.2. Mechanismus der Östrogen-Cholestase

Wie oben ausgeführt, handelt es sich bei der Gallebildung um eine extrem komplexe, noch keineswegs verstandene Sekretionsleistung der Leber. Dieser Vorgang kann auf allen Stufen durch chemische Substanzen gestört werden, was zu einer Verminderung des Gallenflusses (= intrahepatische Cholestase), mit allen seinen Folgeerscheinungen wie Ikterus, Pruritus, Fettdiarrhoe usw. führt. Zu den medizinisch bedeutsamen Cholestatika gehören die Östrogene, die physiologisch bei einer Schwangerschaft in hohen Konzentrationen auftreten (Schwangerschaftscholestase), aber auch in fast allen oralen Kontrazeptiva vorhanden sind, sowie bei der Therapie von Klimakteriumsbeschwerden, Mammakarzinomen, Prostataadenomen und -karzinomen eingesetzt werden. Da man Östrogen, vor allem bei den zuletzt genannten Beispielen in relativ hohen Dosen gibt, tritt als unerwünschte Nebenwirkung häufig eine intrahepatische Cholestase auf (42-46). Mit dem zunehmenden Einsatz dieser Substanzklasse in der Medizin, wurde auch die Grundlagenforschung verstärkt, um Einsicht in die Pathogenese zu gewinnen. So konnte gezeigt werden, daß Östrogene den gallensäure-unabhängigen Gallenfluß erniedrigen (17,47,48), sowie die Sekretion von BSP (49-53) und Gallensäuren (17,54-56) hemmen. Verschiedene Ansätze, die biochemischen Mechanismen der Östrogencholestase zu untersuchen, erbrachten zwei Hypothesen.

1. Ein bei Östrogenbehandlung erhöhter Cholesterolestergehalt der Plasmamembran führt zu einer veränderten Membranfluidität (47,48,56), was zu einer Erniedrigung der Na^+, K^+-ATPase-Aktivität und damit zur Reduktion des Gallenflusses und der Gallensäuresekretionskapazität führt.

2. Forker (52) postulierte 1969 eine erhöhte Permeabilität des Gallentraktes als mögliche Ursache der Östrogen-Cholestase. Dabei soll es über die parazelluläre

Rückdiffusion von Gallenbestandteilen (v.a. Gallensäuren) und Wasser zu einer Verminderung des Gallenflusses kommen. Bereits 1971 stellten Gumucio und Valdivieso (17) diese Theorie in Frage. Sie konnten zeigen, daß Ethinylöstradiol zwar den Gallensäure-unabhängigen Fluß reduziert, aber in der Stimulation des Gallenflusses durch Gallensäuren kein Unterschied zu Kontrolltieren bestand. Ferner waren die gegenüber Kontrollen erhöhten Konzentrationen der Galle an Gallensäuren (17) und BSP (52,53), die bei EE-Tieren beobachtet wurden, nicht mit einer Permeabilitätserhöhung des Gallentraktes und der Rückdiffusion dieser Substanzen ins Blut zu vereinbaren. Trotz dieser Bedenken fand diese Hypothese als Ursache der Östrogen-Cholestase Eingang in verschiedene Reviews (46,57-61) und wurde 1981 noch mehrfach von einigen Autoren vertreten (62,63). Eine zentrale Frage dieser Dissertation war die Klärung dieser widersprüchlichen Ergebnisse (64-66).

2. ZIEL DER ARBEIT

1. In dieser Dissertation sollte zunächst noch einmal die Leistungsfähigkeit des Modells der Hämoglobin-frei isoliert perfundierten Rattenleber kritisch geprüft werden. Dabei sollten folgende Fragen den Schwerpunkt der Untersuchungen bilden:
   A. Wie lange kann diese Perfusion sinnvoll durchgeführt werden?
   B. Vergleich zwischen offener und rezirkulierender Perfusion.
   C. Vergleich zu anderen Modellsystemen.

2. Seit mehr als 10 Jahren wird die Hypothese von Forker (52), daß eine Permeabilitätserhöhung des parazellulären Weges Ursache der Östrogen-Cholestase sei, kontrovers diskutiert. Am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber sollte der Versuch unternommen werden, diese Streitfrage zu klären.

3. Inerte Moleküle, wie Sucrose oder Inulin, werden seit langer Zeit als Marker für die Permeabilität des Gallentraktes eingesetzt. Bis heute existieren jedoch nur indirekte Hinweise, die für den parazellulären Eintritt dieser Substanzen in die Galle sprechen (33,37-39). In letzter Zeit gibt es sogar Meinungen, die einen transzellulären Transport favorisieren (15,16,41). Auch bei diesem Problem sollte versucht werden, mit Hilfe der isoliert perfundierten Rattenleber einer Lösung näherzukommen.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien

17ß-Ethinylöstradiol und Propylenglykol stammte von Sigma GmbH, München, α-Naphthylisothiocyanat von Eastman Kodak Co, New York (USA), Östradiol-17ß-valerat (Progynon^{R}) von Schering AG, Berlin, Sulfobromophthalein (Dinatriumsalz) von Merck AG, Darmstadt, Taurocholsäure (Natriumsalz) von Fluka AG, Buchs (Schweiz), Adrenalin (Suprarenin^{R}) von Hoechst AG, Frankfurt/M. Enzyme (LDH, G6PDH, Hexokinase, usw.) und Cosubstrate (NADH, NADPH, ATP, usw.) lieferte Boehringer GmbH, Mannheim, alle übrigen Substanzen waren von Merck AG, Darmstadt.

3.1.2. Radiochemikalien

^{3}H-Taurocholsäure (6.6 Ci/mmol), ^{14}C-Sucrose (3.6 mCi/mmol), ^{3}H-Wasser (250 µCi/ml) und ^{32}P-Orthophosphorsäure (2 mCi/ml) wurden von NEN Chemicals, Dreieich, bezogen; ^{35}S-BSP (70.8 mCi/mmol) und ^{14}C-Methoxyinulin (13.8 mCi/mmol) waren von Amersham Buchler GmbH, Braunschweig.

3.1.3. Versuchstiere

Für alle Experimente wurden männliche Wistar-Ratten aus eigener Zucht von 180 - 250 g verwendet. Die Tiere erhielten Altromin - Trockenfutter und Wasser ad libitum. Sie wurden bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit bei einem 12 h Tag/Nacht-Zyklus gehalten.

3.2. Methoden

3.2.1. Vorbehandlung der Versuchstiere

Alle Experimente zur Leberperfusionstechnik (4.1.) sowie zum parazellulären Weg (4.3.) wurden mit unbehandelten Tieren durchgeführt. Für die Untersuchungen zur intrahepatischen Cholestase wurden die Tiere wie folgt vorbehandelt:

1. Ethinylöstradiol in Propylenglykol, 5 mg/(kg x Tag), s.c., über 5 Tage.
2. Östradiol-17ß-valerat in Olivenöl, 1 mg/(kg x Woche), s.c., über 1 - 20 Wochen.
3. α-Naphthylisothiocyanat-Suspension in Olivenöl, 250 mg/kg, p.o., 9 h vor der Leberperfusion.
4. Kontrolltiere erhielten das entsprechende Lösungsmittel über denselben Zeitraum. Die Ergebnisse der verschiedenen Kontrollgruppen waren identisch, sodaß sie zu einer Gruppe zusammengefaßt werden konnten.

3.2.2. Gallenfistel-Ratten

Unter Urethannarkose (1,5 g/kg, i.p.) wurde direkt unterhalb der Leber das Abdomen 2 cm aufgeschnitten und das Duodenum leicht herausgezogen. Der gestreckte Gallengang wurde 1 cm distal zum Leberhilus angeschnitten, eine Polyethylenkanüle (0,4 mm ID) eingeführt und festgebunden. Die Operationswunde wurde für die Dauer des Versuchs (max. 1 h) mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet und abgedeckt. Die Körpertemperatur des Tieres wurde mittels thermostatisiertem OP-Tisch und einer Lampe auf 37°C gehalten.

3.2.3. Leberperfusionstechnik

Die Operation verlief unter Äther- oder Urethannarkose (falls zuvor eine Gallenfistel gelegt wurde). Einzelheiten der angewandten Methode beschrieben Scholz et al. (67) und Sies (68) ausführlich. Als Perfusionsmedium diente Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer (18 mM $NaHCO_3$, 1,25 mM $CaCl_2$, glucosefrei) (69), wobei das Medium nicht mit hydrostatischem Druck durch die Leber gedrückt, sondern mittels einer Rollenpumpe ein konstanter Fluß von $\geq$ 3 ml/(min x g Leber) eingestellt wurde. Über einen Schlauchoxygenator, bestehend aus einem thermostatisierten Messingblock und einem 10 - 12 m langen, gasdurchlässigen Silikon-Kautschukschlauch (2 mm ID, 0,2 mm Wandstärke; Fa. Detakta, Hamburg) wurde das Medium mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) begast und auf eine Temperatur von 37,0°C gebracht, so daß der pH-Wert zwischen 7,3 - 7,4 lag (Abb. 1). Der Sauerstoffverbrauch ca 2 µmol O_2/(min x g) wurde polarographisch mit einer Platinelektrode (Elektronikwerkstatt des DFG-Sonderforschungsbereichs 51, München) kontrolliert.
Über eine Gallengangskanüle (0,4 mm ID) wurde die Galle tropfenweise gesammelt. Der Gallenfluß errechnete sich aus dem Tropfengewicht pro Tropfzeit und wurde pro Gramm Leberfrischgewicht bzw. 100 g Körpergewicht angegeben. Die Verzögerungszeit zwischen der Sekretion am Gallencanaliculus und dem Erscheinen einer Substanz am Ende der Gallenkanüle (Volumen der Gallengänge: 2,9 µl/g Leber, und Volumen der Kanüle) ließ sich mit ^{3}H-Wasser oder mit einer schnell in die Galle sezernierten Substanz wie ^{3}H-Taurocholat oder ^{35}S-BSP ermitteln.

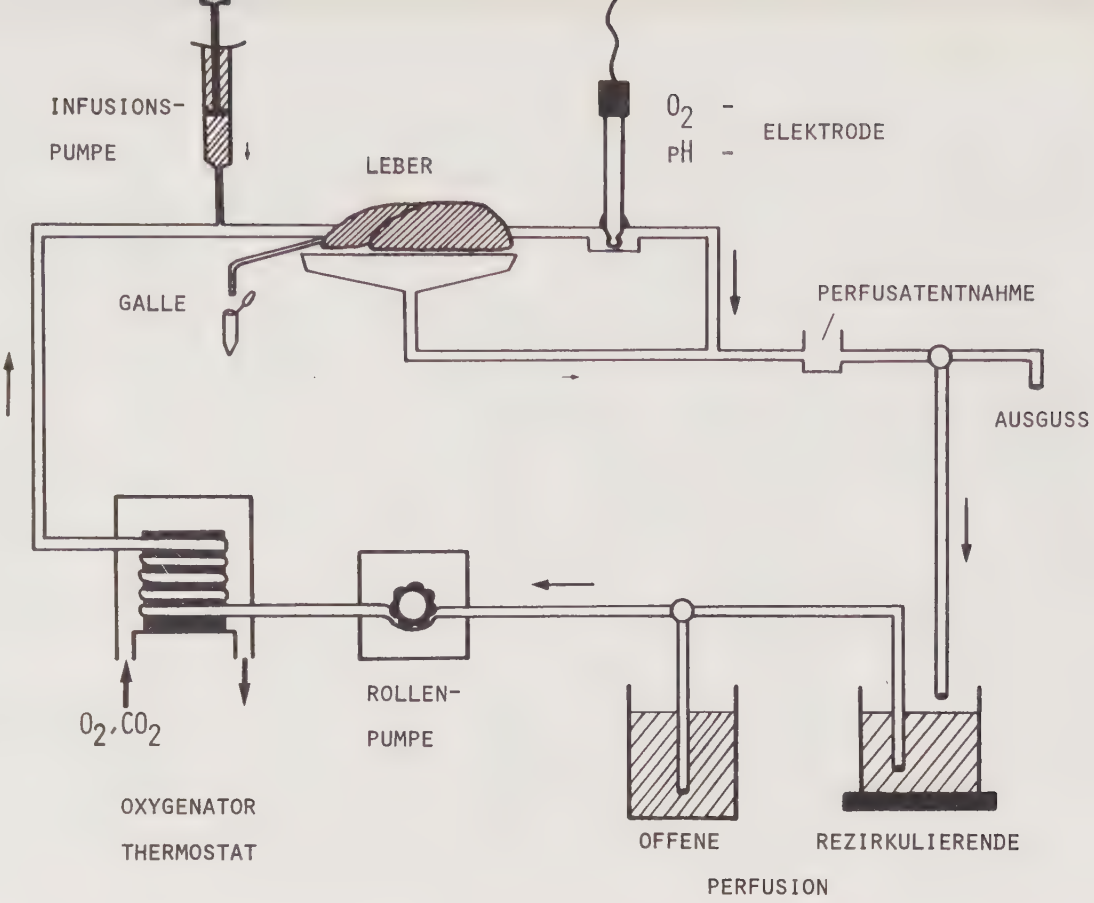

Abbildung 1: Schema der Perfusionsapparatur

3.2.4. Versuchsanordnungen

3.2.4.1. Experimente zur Perfusionsmethode

Nach einer offenen Vorperfusionsperiode von 30 Minuten wurde die Leber weitere 2 h offen bzw. rezirkulierend (200 ml Medium) perfundiert. Dabei wurde der Gallenfluß und das Auftreten von Glucose, Lactat, Pyruvat und LDH im Perfusat verfolgt.

3.2.4.2. Experimente zur Östrogen-Cholestase

Jedes Experiment begann mit einer Vorperfusionsphase von 40 min. In den ersten 30 min sinkt der Gallenfluß durch das Herausspülen endogener Gallensäuren stark ab, bleibt dann aber relativ konstant. Der Fluß zwischen 30 und 40 min wurde deshalb als "basaler GF" genommen. Nach 40 min wurde auf rezirkulierende Perfusion umgeschaltet: 200 ml Perfusionsmedium enthielt 1 mM Sucrose (markiert mit 2,5 µCi ^{14}C-Sucrose) oder 0,7 µM Inulin (markiert mit 10 µCi ^{14}C-Inulin) und 10 µM TC (markiert mit 1 µCi ^{3}H-TC). Nach 40 min rezirkulierender Perfusion wurde TC [1,2 µmol/(min x 100 g KG) ; gleiche spezifische Radioaktivität wie im rezirkulierenden Perfusat] über 10 min direkt vor der Leber infundiert. Nachdem der Gallenfluß nach der Absetzung der Infusion wieder abgesunken war, wurde durch das Aufrichten der Gallenkapillare der maximale Gallendruck der Leber bestimmt. Abbildung 2 verdeutlicht den Ablauf des Experiments sowie die Zeitpunkte, an denen einzelne Parameter bestimmt wurden.

Alternativ zu diesen Experimenten enthielt das rezirkulierende Perfusat 60 mg BSP/kg KG (= ca 75 µM) markiert mit 10 µCi ^{35}S-BSP.

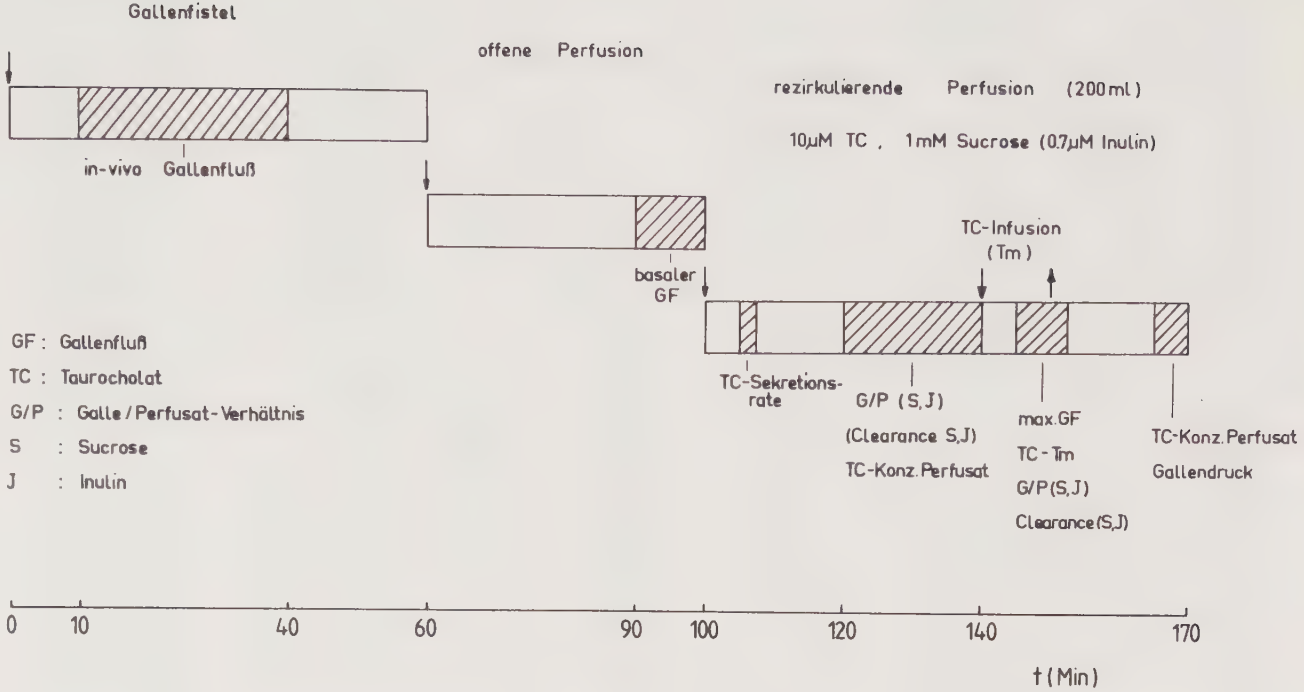

Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der Experimente

3.2.4.3. Experimente zum parazellulären Weg
Alle Versuche begannen mit einer offenen Vorperfusion von 40 min. Um den zeitlichen Verlauf der intrazellulären und biliären Äquilibrierung von Sucrose aufzunehmen, wurden die Lebern mit 200 ml Medium (1 mM Sucrose, markiert mit 5 µCi ^{14}C-Sucrose) unterschiedlich lang perfundiert (5 - 60 Min.). Vor der Entnahme wurde jede Leber für 3 min offen perfundiert, um die extrazelluläre Sucrose weitgehenst herauszuspülen. Anschließend wurde die Leber in Perchlorsäure in einem Pottergefäß homogenisiert, geschüttelt, das denaturierte Protein abzentrifugiert und die Konzentration der Sucrose im Überstand bestimmt.
Bei einem Teil der Lebern wurde die offene Perfusion (nach 10 bzw. 40 min rezirkulierender Perfusion) über weitere 70 min fortgesetzt und dabei insbesondere der zeitliche Verlauf der biliären Sucrosekonzentration verfolgt.

3.2.5. Enzym- und Metabolitbestimmungen
Lactatdehydrogenase: nach Bergmeyer (70)
Glucose, Lactat, Pyruvat: nach Bergmeyer (70)

3.2.6. Radioaktivitätszählung

300 µl Perfusat wurde in "mini vials" (5 ml, Fa. Zinsser) mit 50 µl 1 N Perchlorsäure und 3,5 ml Szintillator (Unisolve I, Fa. Zinsser) versetzt und ausgezählt (Flüssigkeitsszintillationszähler BF 5001, Fa. Berthold).
Galletropfen wurden nach Verdünnung auf 300 µl entsprechend behandelt und analysiert.

Mehrfachmarkierung:
Die Trennung von bis zu drei Isotopen (^{3}H, ^{14}C oder ^{35}S, ^{32}P) war mit Hilfe eines Rechenprogramms für den dem Zähler angeschlossenen Rechner (Diehl Algotronic) in kurzer Zeit möglich: die jeweiligen Einstreufaktoren der Isotope in die

Kanäle der anderen mußten vorher mit Zählproben des reinen Isotops bestimmt und dann im Rechner gespeichert werden.

3.2.7. Bestimmung von TC und BSP

Die eingesetzte Konzentration an TC wurde mit ^{3}H-TC markiert und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität ließ sich die jeweilige Konzentration in der Galle und im Perfusat bestimmen. Mit BSP (^{35}S-BSP markiert) wurde analog verfahren.

3.2.8. Trennung von BSP und BSP·SG im Perfusat

Sephadex G15 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) bindet über einen pH-Bereich von 4,0 - 6,5 bei Zimmertemperatur BSP zu ca. 80 % und BSP·SG zu ca. 20 %. Diese Eigenschaft kann zur Trennung von BSP und seinem Glutathionkonjugat ausgenutzt werden, sofern die Bindungskapazität von $<0{,}05$ nmol BSP/µl Sephadex-Bettvolumen nicht überschritten wird. Mit Hilfe der mittels Reinsubstanzen exakt bestimmten Bindungskonstanten lassen sich die Mengenanteile von BSP und BSP·SG im Perfusat errechnen. Dieses Verfahren wurde von Krell et al. (71) und Hoeke (72) ausführlich beschrieben.

3.2.9. Dünnschichtchromatographische Trennung der BSP-Metabolite in der Galle

DC-Platten:	Kieselgel 60 (Fa. Merck, Darmstadt)	
Proben:	ca. 5 µl Galle	
Fließmittel:	tert. Butanol/Wasser	2 : 1

Nach Anfärben der Flecke mit Ammoniakdämpfen wurden die Metabolite ausgekratzt, vom Kieselgel mit Wasser eluiert, ausgezählt und über die spezifische Radioaktivität die Konzentration bestimmt.

3.2.10. Statistische Methoden

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Signifikanz zeigt ein p-Wert von $<0,05$ an, der bei paarweisem Vergleich über den Students-t-test, bei mehrfachem Vergleich mit einer Kontrolle über den Dunnett-Test (73) ermittelt wurde. Die beiden Parameter δ und K der Clearance-Gleichung (4.2.) wurden iterativ über eine nichtlineare Regressionsanalyse den experimentellen Daten angepaßt. Eine genaue Beschreibung dieser statistischen Methode erfolgte durch Strasberg et al. (74).

4. E R G E B N I S S E

4.1. Untersuchung zur Leberperfusionsmethode

4.1.1. Gallenfluß und LDH-Efflux der isoliert perfundierten Rattenleber

Von einem adequaten Modell zum Studium der Gallensekretion muß man fordern, daß für die Dauer des Experiments das Organ weitgehenst intakt bleibt und die Gallensekretion aufrecht erhalten wird. Bei der Hämoglobin-frei isoliert perfundierten Rattenleber sinkt der Gallenfluß über 3,5 h Gesamtperfusionszeit langsam kontinuierlich ab (Abb. 3). Es bestehen dabei zwischen dem offenen und dem rezirkulierenden System keine signifikanten Unterschiede. Dies ist von besonderer Bedeutung, da zwischen beiden Betriebsarten an ein und derselben Leber häufig gewechselt wird. Während der Perfusion kommt es zur Abgabe des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase (Abb. 3). Der LDH-Efflux, der eine große Variation zwischen den einzelnen Experimenten zeigt, nimmt nach 130 min dramatisch zu, wobei der Anstieg im rezirkulierenden System etwas früher beginnt. Vergleicht man den zeitlichen Verlauf des Gallenflusses mit dem Vitalitätskriterium LDH-Efflux, so steht dem kontinuierlichen Abfall des Flusses der exponentielle Anstieg der LDH nach 130 min gegenüber. Der LDH-Efflux ist somit kein zuverlässiger Indikator für die nachlassende Fähigkeit der Leber zur Gallebildung.

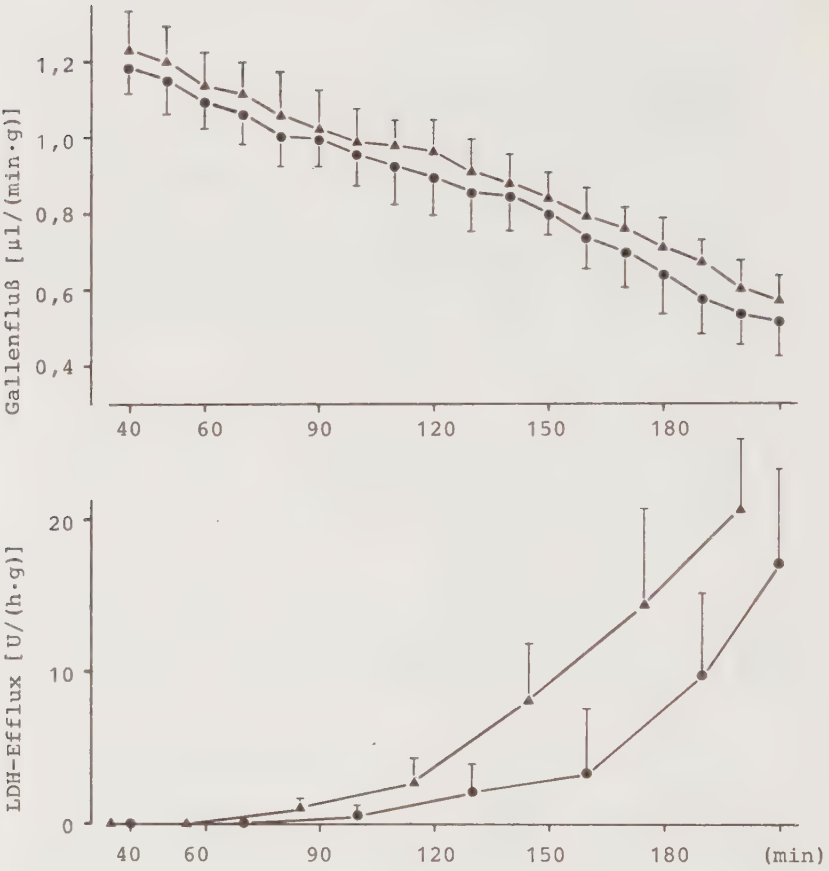

Abbildung 3:

Gallenfluß und LDH-Efflux der isoliert perfundierten Rattenleber in Abhängigkeit von der Perfusionszeit. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD von je 6 Lebern, die nach einer offenen Vorperfusionsphase von 30 min weitere 3 h offen (●) bzw. mit 200 ml Medium rezirkulierend (▲) perfundiert wurden.

4.1.2. Metabolismus im offenen und rezirkulierenden Perfusionssystem

Da das Perfusionsmedium keinerlei organische Substanzen enthält, gibt die isoliert perfundierte Leber Glucose, Lactat und Pyruvat ins Perfusat ab. Bei Rezirkulation des Mediums akkumulieren diese Metabolite und erreichen nach 90 min ein annäherndes Gleichgewicht. Beim Vergleich beider Betriebsarten (Abb. 4) gibt es keinen Unterschied im Glucose-Efflux. Der Ausstrom von Lactat und insbesondere von Pyruvat im offenen System ist jedoch erheblich größer; im rezirkulierenden System versiegt der Efflux dieser Metabolite nach 50 min vollständig, was andeutet, daß hier eine Gleichgewichtskonzentration im Perfusat erreicht wurde (Lactat: 1,6 mM, Pyruvat: 0,2 mM). Sies (68) gibt die intrazelluläre Konzentration von Lactat und Pyruvat mit 2,1 mM/0,3 mM an. Das Konzentrations-Verhältnis von Lactat und Pyruvat (L/P) im effluenten Perfusat spiegelt den cytosolischen Redoxstatus der Pyridinnucleotide wieder (68). Das L/P - Verhältnis ist im rezirkulierenden System etwas höher und steigt kontinuierlich an. Dies könnte eine sich langsam verschlechternde Sauerstoffversorgung, bedingt durch die steigende Viskosität des Mediums, anzeigen.

Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Organs ohne spezielle O_2-Träger zu gewährleisten, wird ein Perfusatfluß von ≥ 3 ml/(min·g) aufrechterhalten. Die Messung einer hohen O_2-Konzentration hinter der Leber bietet jedoch keine Gewähr für eine optimale Versorgung, da Perfusat über eröffnete Anastomosen die Sinusoide teilweise umgehen kann. Ein empfindlicherer Indikator für O_2-Mangel ist das L/P-Verhältnis. Reduziert man den Perfusatfluß auf 2 ml/(min·g), so steigt der Quotient augenblicklich auf Werte > 20 an, der Glucose-Efflux ist leicht erhöht und der Gallenfluß stark erniedrigt (Tabelle 1 A). Der gesamte Vorgang ist, mit Ausnahme des Gallenflusses, voll reversibel.

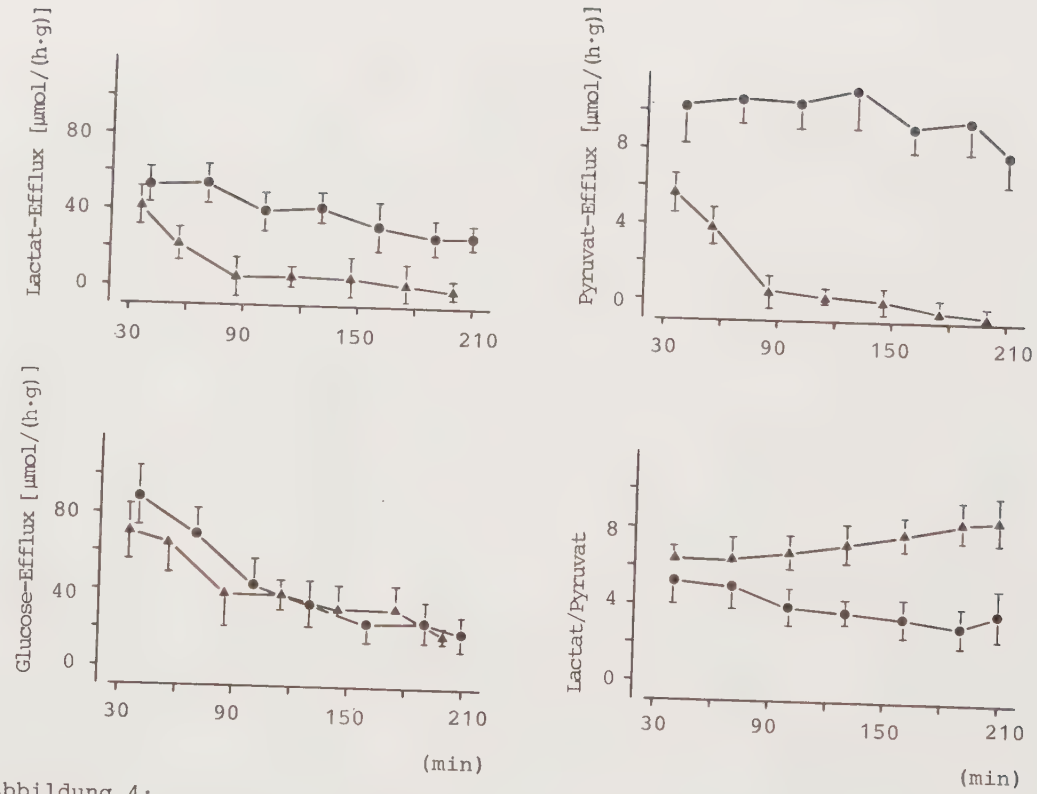

Abbildung 4:

Lactat-, Pyruvat- und Glucose-Efflux der isoliert perfundierten Rattenleber sowie das Lactat/Pyruvat-Verhältnis im Perfusat in Abhängigkeit von der Perfusionszeit. Angegeben sind die Mittelwerte + SD von je 6 Lebern, die nach einer Vorperfusionsphase von 30 min weitere 3 h offen (●) bzw. mit 200 ml Medium rezirkulierend (▲) perfundiert wurden.

Ein weiterer kritischer Punkt für die Lebensdauer des isolierten Organs und den Gallenfluß ist die Frage, ob der Glykogengehalt der Leber, angesichts der enormen Verluste durch den Efflux ins Perfusat, zur Energieversorgung ausreicht. Zu diesem Zweck wurde die Glykogenolyse durch Adrenalininfusion stark stimuliert. Wie den Efflux-Raten aus Tabelle 1 B zu entnehmen ist, werden die intrazellulären Konzentrationen von Glucose und Pyruvat stark, von Lactat nur mäßig erhöht. Das L/P-Verhältnis sinkt dabei ab, der Gallenfluß wird stimuliert. Auch dieser Vorgang ist innerhalb weniger Minuten voll reversibel. Wird die Adrenalininfusion wiederholt, so sind diese Effekte reproduzierbar, wenn auch nicht quantitativ. Der Glykogengehalt ist somit für die Lebensdauer der isoliert perfundierten Leber nicht limitierend.
Eine Beeinflussung des Gallenflusses durch Infusion von Glucose (10 mM), Lactat (2 mM) oder Pyruvat (0,3 mM) alleine bzw. jede Kombination zwischen den 3 Substraten war nicht festzustellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tabelle 1: Gallenfluß und Efflux verschiedener Metabolite ins Perfusat unter Stimulation der Glykogenolyse.

Nach einer Vorperfusion von 30 min wurde im offenen System 15 min lang (A) der Perfusatfluß auf 2 ml/(min·g) reduziert bzw. (B) Adrenalin (10^{-7} M) infundiert.

Perfusionszeit (Min)	Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	Gallenfluß
		[µmol/(h·g)]			[µl/(min·g)]
A. O_2-Mangel					
30	73,6	53,4	10,6	5,0	1,23
35	88,9	88,9	3,5	25,6	0,84
50	61,6	47,1	8,3	5,7	0,92
B. Adrenalin-Infusion					
30	78,0	53,6	9,5	5,6	1,18
35	175,0	69,7	20,0	3,5	1,46
50	51,0	48,2	9,5	5,0	1,19

4.1.3. Taurocholatsekretion der isoliert perfundierten Rattenleber

Taurocholat, Hauptbestandteil der Rattengalle in vivo, wird als Modellsubstanz zur Bestimmung der Sekretionskapazität der Leber eingesetzt. Durch die Verwendung der konjugierten Gallensäuren umgeht man den limitierenden Schritt der Konjugation. Nach der Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs sinkt die Sekretion endogener Gallensäuren stark ab und erreicht nach ca. 30 min konstante Werte um 1 - 2 nmol/(min·g) (26). Man kann daher die Sekretion von Gallensäuren durch die Infusion von ^{3}H-TC studieren (Tabelle 2). Der Zeitpunkt des Infusionsbeginns, nach 40 min oder erst nach 80 min, hat trotz dabei abgesunkenem basalen Gallenfluß (Abb. 3) keinen Einfluß auf die gemessenen Werte.

Tabelle 2: Sekretion von Taurocholat in Lebern von Kontrolltieren.
Experimentelle Details sind im Kapitel 4.2. (Östrogen-Cholestase) bzw. Kapitel 3 (Materialien und Methoden) beschrieben.

Basaler Gallenfluß:	1,34	±	0,12	µl/(min·g)
TC-Infusion 1,2 µmol/(min·100 g KG):				
Gallenfluß:	3,38	±	0,26	µl/(min·g)
TC-Konzentration (Galle):	72,0	±	4,0	mM
TC-Sekretionsrate:	238,8	±	10,6	nmol/(min·g)

4.1.4. Permeabilität der "tight junctions"

Die Galle wird von den Sinusoiden durch die Zonula occludens ("tight junctions") sehr effektiv getrennt. Eine Permeabilitätserhöhung dieser Zone jedoch führt zur Cholestase (39,71,72). Um die Permeabilitätseigenschaften der "tight junctions" zu prüfen, wurden inerte Moleküle wie Sucrose, Inulin oder Orthophosphat ins rezirkulierende Medium gegeben. Tabelle 3 zeigt die Galle/Perfusat-Verhältnisse und Clearance-Raten dieser Stoffe bei Kontrolltieren. Dabei wird deutlich, daß steigende Molekülgröße und insbesondere negative Ladungen den Durchtritt durch diese Barriere erschweren. Dies erklärt, warum es möglich ist, mehr als tausendfach höhere Konzentrationen von organischen Anionen (z.B. Gallensäuren, Bilirubindiglucuronid, usw.) in der Galle zu halten, obwohl ein rascher Ausgleich von Wasser und anorganischen Kationen (Na^+, K^+) über den parazellulären Weg erfolgt (16,35).

Tabelle 3: Galle/Perfusat-Verhältnisse und Clearance-Raten inerter Moleküle der isoliert perfundierten Rattenleber.

	G/P	Clearance [µl/(min·g)]
^{14}C-Sucrose	0,257 ± 0,033	0,286 ± 0,047
^{14}C-Inulin	0,055 ± 0,010	0,065 ± 0,010
$^{32}P_i$	0,009 ± 0,004	0,010 ± 0,005

Die Angaben sind Mittelwerte ± SD von je 12 Tieren. Experimentelle Details sind in Material und Methoden bzw. im Kapitel 4.2. (Östrogen-Cholestase) beschrieben.

4.2. Untersuchungen zur Östrogen-Cholestase

4.2.1. Die Ethinylöstradiol-induzierte Cholestase

Um die Hypothese von Forker (52), daß eine Permeabilitätserhöhung des Gallentraktes Ursache der Östrogen-Cholestase sei,zu bestätigen oder zu widerlegen, wurden die Effekte von Ethinylöstradiol-(EE)- und α-Naphthylisothiocyanat-(ANIT)-Behandlung auf die Gallebildung und die Permeabilität der "tight junctions" am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber untersucht. Da nach Ergebnissen von Krell et al. (71,74), die ANIT-Cholestase durch erhöhte Permeabilität des parazellulären Weges verursacht wird, so sollte es möglich sein, die Östrogen-Cholestase im direkten Vergleich mit Kontrolltieren (intakten "tight junctions") und ANIT-Tieren (permeablen "tight junctions") exakt einzuordnen.

4.2.1.1. Effekte der Ethinylöstradiol-Behandlung auf das Leber- und Körpergewicht

Die Behandlung männlicher Wistar-Ratten mit EE führte zu einem nicht signifikanten Körpergewichtsverlust von 6,4% (von 204 ± 11 g auf 191 ± 8 g), während die Kontrollen in dieser Zeit ihr Körpergewicht um 6,7% erhöhten (von 192 ± 9 g auf 205 ± 10 g). Die Lebergewichte der EE-behandelten Tiere waren signifikant erhöht (Kontrollen: 36,0 ± 2,5 g Lebergewicht/kg Körpergewicht;EE: 46,8 ± 2,9; $p < 0,01$). Das Körpergewicht der ANIT-Tiere änderte sich während der kurzen Behandlungszeit nicht (210 ± 6 g); ebenso waren keine signifikanten Änderungen im Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht (34,4 ± 2,8) festzustellen.

Tabelle 4: Effekte der Ethinylöstradiol- und α-Naphthylisothiocyanat-Vorbehandlung auf den Gallenfluß in vivo und in der isoliert perfundierten Rattenleber.

Vorbehandlung	In vivo Gallenfistel		Isoliert perfundierte Leber: Basaler Gallenfluß		Isoliert perfundierte Leber: Maximaler Gallenfluß		Max. GF / Basal. GF
	A	B	A	B	A	B	
Kontrollen	2,20 ± 0,16 (9)	7,87 ± 0,52	1,34 ± 0,12 (12)	4,86 ± 0,63	3,34 ± 0,31 (12)	12,11 ± 1,28	2,50 ± 0,26
EE	1,22 ± 0,08* (6)	5,54 ± 0,25*	0,74 ± 0,07** (12)	3,43 ± 0,29**	1,89 ± 0,28** (12)	8,76 ± 1,18**	2,57 ± 0,41
ANIT	-		0,99 ± 0,26** (12)	3,27 ± 0,87**	1,56 ± 0,59** (12)	5,14 ± 1,90**	1,55 ± 0,34**

Angegeben sind die Mittelwerte ± SD ausgedrückt in Mikroliter pro Minute pro Gramm Lebergewicht (Spalte A) bzw. in Mikroliter pro Minute pro 100 g Körpergewicht (Spalte B) von der in Klammern stehenden Anzahl von Versuchstieren. EE = Ethinylöstradiol, ANIT = α-Naphthylisothiocyanat, GF = Gallenfluß.
* $p < 0,001$ (Students t-Test), ** $p < 0,01$ (Dunnetts Test)

4.2.1.2. Gallenfluß und Taurocholatsekretion

Tabelle 4 zeigt den Gallenfluß von Kontrollen, EE- und ANIT-behandelten Tieren. Ethinylöstradiol verursacht eine Erniedrigung des Gallenflusses um 45 % (bezogen auf das Lebergewicht) bzw. um 30 % (bezogen auf das Körpergewicht). Es ist besonders bemerkenswert, daß diese Prozentzahlen sowohl für den Gallenfluß des narkotisierten Tieres wie auch für den basalen und maximal Taurocholat-stimulierten Gallenfluß der isolierten Leber gelten. Dies unterstreicht die Anwendbarkeit des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber für Untersuchungen dieser Art. Die Cholestase von Lebern aus ANIT-behandelten Tieren unterschied sich deutlich von denen der EE-behandelten Tiere; der basale Gallenfluß war weniger erniedrigt, der maximale Gallenfluß mehr, was zu einem starken Abfall des Stimulationsverhältnisses durch TC (Max. Gallenfluß/Basaler Gallenfluß) führte. ANIT-behandelten Tieren wurde vor der Leberperfusion keine Gallenfistel gelegt, da die schnell fortschreitende Schädigung der Leber durch das ANIT die Vergleichbarkeit von in vivo-Gallenfluß und dem Gallenfluß des isolierten Organs in Frage stellt.

Die Effekte von EE auf die Sekretionsleistung der Rattenleber zeigt Tabelle 5. Unter physiologischen TC-Infusionsraten (Tabelle 5 A), wie auch unter Bedingungen, bei denen die maximale Sekretionskapazität der Leber überschritten ist (Tabelle 5 B), war die TC-Sekretionsrate der EE-behandelten Tiere signifikant erniedrigt ($p < 0,01$). Diese Ergebnisse bestätigen Versuche am Ganztier (17,48,54). Die Gleichgewichtskonzentration von TC im Perfusat war unter EE-Behandlung bei beiden Infusionsraten nicht signifikant erhöht. Die Bestimmung von TC im Perfusat erlaubt zwar nicht zwischen den Gallensäuren zu unterscheiden, die von der Leber nicht aufgenommen wurden und denen die aus der Galle parazellulär zurückfließen; jedoch zeigt der Vergleich mit Ergebnissen von Ratten mit geschädigten "tight junctions" (ANIT-Tiere), wo der Rückfluß von Gallenbestandteilen bereits nachgewiesen wurde (71,74), substanzielle Unterschie-

Tabelle 5: Taurocholatsekretion der isoliert perfundierten Rattenleber bei verschiedenen Taurocholatinfusionsraten.

	Kontrollen	EE	ANIT
A) Niedere Infusionsraten			
Konzentration in der Galle (mM)	14,2 ± 1,4	18,7 ± 2,5*	7,2 ± 1,9*
Sekretionsrate [nmol/(min·g)]	25,4 ± 3,1	19,3 ± 2,3*	8,7 ± 3,3*
Restmenge an TC im Perfusat (nmol/g)	8,3 ± 5,8	8,0 ± 3,8	33,9 ± 20,2*
B) Hohe Infusionsraten			
Max. Konzentration in der Galle	71,5 ± 4,8	84,7 ± 7,2*	21,0 ± 9,6*
Max. Sekretionsrate T_m [nmol/(min·g)]	239,0 ± 10,6	160,0 ± 21,7*	32,8 ± 24,0*
Restmenge an TC im Perfusat (nmol/g)	81,0 ± 28,0	117,0 ± 55,0	1135,0 ± 227,0*

A) Cholerese, die durch die rezirkulierende Perfusion von 200 ml Medium mit 2 µmol Taurocholat (TC) hervorgerufen wurde.

B) Cholerese durch die konstante Infusion von TC [350 nmol/(min·g)] .
Angegeben sind die Mittelwerte ± SD von je 12 Tieren, * $p < 0,01$ (Dunnetts Test)

de. Die ANIT-behandelten Tiere waren nicht in der Lage hohe Konzentrationen von TC in der Galle zu halten (Tabelle 5 A,B). Dies führte zu einer Verringerung des Gallenflusses und zu einer vier- bis zehnfach erhöhten Gleichgewichtskonzentration von TC im Perfusat. Diese vollkommen unterschiedlichen Ergebnisse, die man nach EE- bzw. ANIT-Behandlung erhält, deuten auf unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen hin.

4.2.1.3. Galle/Perfusat-Verhältnisse und Clearance-Raten von Sucrose und Inulin

Um Permeabilitätsänderungen zwischen den Sinusoiden und der Galle nachzuweisen werden inerte Moleküle (Sucrose, Inulin) verwendet. Forker (52,76) und Wheeler et al. (77) entwickelten ein mathematisches Modell, das den Eintritt inerter Moleküle in die Galle durch Diffusion und "solvent drag" beschrieb. Die folgenden Gleichungen, die diese Autoren verwendeten, sind von theoretischen Überlegungen über das Verhalten biologischer Membranen abgeleitet (78-80):

$$C = \frac{(1 - \sigma)F}{1 - \sigma \cdot e^{-(1-\sigma)F/K}} \qquad (1)$$

C ist die Clearance des inerten Moleküls, σ ist der Reflektionsfaktor, F ist der Gallenfluß und K der Diffusionspermeabilitätskoeffizient und

$$R = \frac{1 - \sigma}{1 - \sigma \cdot e^{-(1-\sigma)F/K}} \qquad (2)$$

wobei R das Galle/Plasma-Konzentrationsverhältnis darstellt. Dieses Modell wurde von Strasberg et al. (74) für Sucrose und Inulin experimentell bestätigt.

Tabelle 6: Galle/Perfusat-Verhältnis und Clearance-Raten inerter Moleküle

	Galle/Perfusat-Verhältnis		Clearance [µl/(min·g)]	
	Spontaner Gallenfluß	Maximale TC-Cholerese	Spontaner Gallenfluß	Maximale TC-Cholerese
Sucrose				
Kontrollen	0,262 ± 0,032	0,165 ± 0,045	0,289 ± 0,055	0,537 ± 0,099
EE	0,391 ± 0,039**	0,237 ± 0,021*	0,243 ± 0,036	0,432 ± 0,058
ANIT	0,818 ± 0,097**	0,802 ± 0,101**	0,735 ± 0,185**	1,169 ± 0,410*
Inulin				
Kontrollen	0,055 ± 0,010	0,042 ± 0,011	0,065 ± 0,010	0,125 ± 0,043
EE	0,072 ± 0,009*	0,041 ± 0,005	0,053 ± 0,010	0,084 ± 0,014
ANIT	0,415 ± 0,040**	0,387 ± 0,031**	0,360 ± 0,089**	0,623 ± 0,193**

Angegeben sind die Mittelwerte ± SD von je 6 Tieren. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (Dunnetts Test)

Gleichung (1) beschreibt die Clearance als Funktion des Gallenflusses und hat zwei limitierende Asymptoten:

(a) bei sehr niedrigen Flußraten entspricht die Clearance dem Gallenfluß (C = F), was die Annäherung an das Diffusionsgleichgewicht zwischen Galle und Plasma darstellt.

(b) mit steigendem Fluß wird die Clearance zunehmend vom "solvent drag"-Effekt bestimmt und nähert sich deshalb an die 2. Asymptote C = $(1 - \delta)F$ an. Unter der Voraussetzung einer eingeschränkten Durchlässigkeit der Barriere für ein bestimmtes Molekül ($\delta > 0$), bedeutet dies, daß ein höherer Gallenfluß die Konzentration des Stoffes in der Galle erniedrigt, seine Clearance jedoch erhöht. Die Ergebnisse in Tabelle 6 stimmen mit diesem Modell für Sucrose und Inulin in Kontrolltieren und in EE-behandelten Ratten überein. Die Erniedrigung der Sucrose- bzw. Inulin-Konzentration während der TC-Cholerese war unter ANIT-Behandlung im Vergleich zu Kontrollen und EE-Tieren wesentlich kleiner. Dies weist auf eine erhöhte Durchlässigkeit des parazellulären Weges bei ANIT hin. Tabelle 6 zeigt auch gegenüber Kontrollen signifikant erhöhte Galle/Perfusat-Verhältnisse bei EE-Behandlung, die von anderen Autoren ebenfalls beschrieben wurden (52,54,62). Diese Erhöhung wird jedoch ausschließlich durch die Erniedrigung des Gallenflusses verursacht, was die mit den Kontrollen nahezu identischen Clearance-Raten beweisen. Ganz im Gegensatz dazu kommt es unter ANIT sowohl zu stark erhöhten Galle/Perfusat-Verhältnissen als auch zur extrem erhöhten Clearance inerter Moleküle.

Diese Überlegungen werden durch die theoretische Analyse nach Forker (52,76) und Wheeler et al. (77) voll bestätigt. Abbildung 5 A und B zeigt die Übereinstimmung zwischen den Kontrollen und den Östrogen-behandelten Tieren, die auch durch die entsprechenden Diffusionspermeabilitätkoeffizienten für Sucrose (Kontrollen: 0,243; EE: 0,273) und Inulin (Kontrollen: 0,037; EE: 0,038) zum Ausdruck kommt. Im Gegensatz dazu waren die K-Werte der ANIT-behandelten Tiere

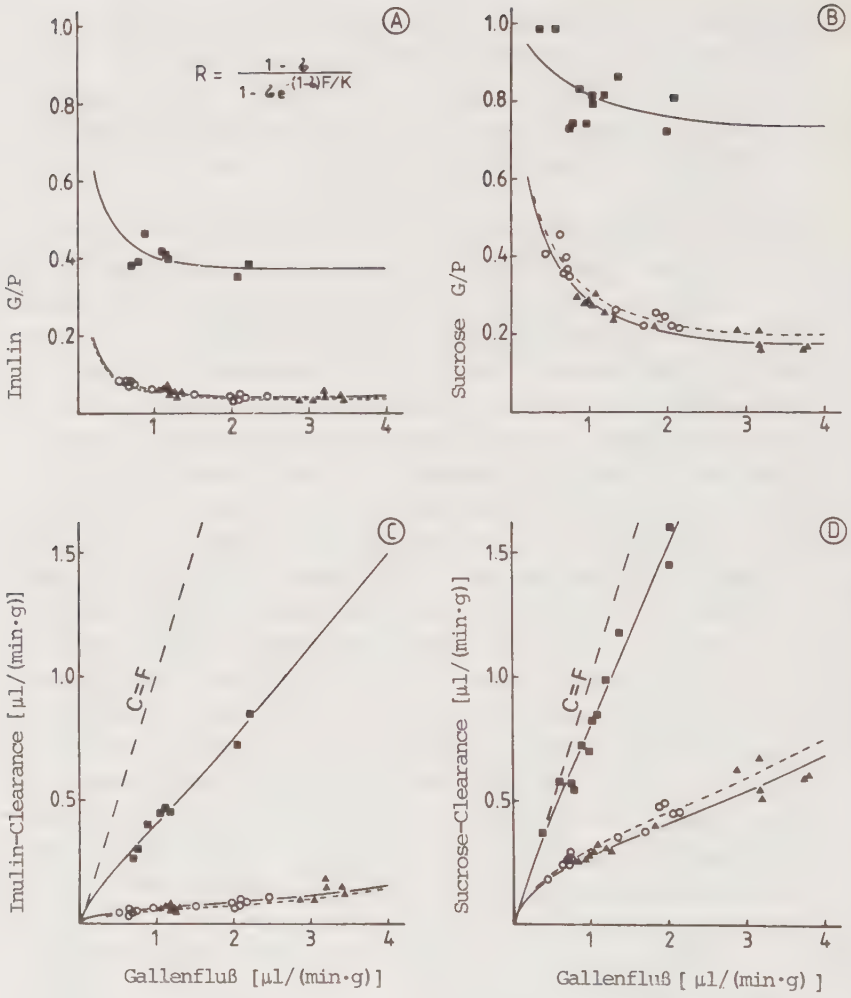

Abbildung 5:

Änderungen der Galle/Perfusat-Verhältnisse und Clearance-Raten von inerten Molekülen nach Ethinylöstradiol-(EE) und α-Naphthylisothiocyanat-(ANIT)-Behandlung. Es wurden Galle/Perfusat-Verhältnisse R (A,B) und Clearance Raten C (C,D) isoliert perfundierter Lebern von EE-behandelten Ratten (○), ANIT-behandelten Ratten (■) und von Kontrolltieren (▲) miteinander verglichen. Die Galle/Perfusat-Gleichung, die in Teil A steht, und die Clearance-Gleichung (C = R·F) wurden verwendet um über eine nichtlineare Regressionsanalyse die Parameter K (Diffusionspermeabilitätskoeffizient) und δ (Reflektionsfaktor) zu bestimmen. Die Kurven durch die Meßpunkte wurden mit Hilfe dieser berechneten Parameter (siehe Text) konstruiert. Eine der beiden Asymptoten (C =F) ist bei den Clearance-Abbildungen eingezeichnet.

für Sucrose (0,807) und für Inulin (0,175) signifikant ($p < 0,01$) erhöht, was auf eine verstärkte Diffusion der inerten Moleküle vom Perfusat in die Galle schließen läßt. Diese Ansicht wird durch die Reflektionsfaktoren in der ANIT-Cholestase bestätigt (Sucrose 0,274; Inulin 0,626), die erheblich niedriger waren als die Werte für Kontrolltiere bzw. bei der EE-Cholestase [Sucrose (Kontrollen: 0,840, EE: 0,822) und Inulin (Kontrollen: 0,959; EE: 0,965)].

Die Auftragungen der Clearance in Abbildung 5 C und D unterstreichen diese Betrachtungen eindrucksvoll. Bei den ANIT-behandelten Tieren zeigt die Annäherung der Kurven an die Grenzgerade C = F den verringerten Widerstand der "tight junctions" für die Bewegung der inerten Moleküle, während andererseits die klare Übereinstimmung zwischen den Kontrollen und den EE-behandelten Tieren eindeutig die Hypothese widerlegt, daß Permeabilitätsänderungen des parazellulären Weges die Ethinylöstradiol-induzierte Cholestase verursachen.

4.2.2. Die Östradiolvalerat-induzierte Cholestase

Wie oben ausgeführt, konnte bei Ratten eine schwere intrahepatische Cholestase durch hohe Dosen von Ethinylöstradiol erzeugt werden, ohne jedoch die Permeabilität des parazellulären Weges zu beeinflussen. Andere Autoren (52,54,62,63) berichteten jedoch über erhöhte Galle/Plasma-Verhältnisse für inerte Moleküle bei ihren Untersuchungen. Obwohl ein Teil dieser Erhöhung auf den erniedrigten Fluß zurückzuführen ist (siehe 4.2.1.3.), so bleibt bei diesen Ergebnissen doch eine geringfügig erhöhte Clearance dieser Moleküle. Diese Tatsache führte zu der Hypothese, daß eine Permeabilitätserhöhung nicht die Ursache, sondern die Folge einer Östrogen-induzierten Cholestase sei (66). Es wurde deshalb versucht mit dem Depotöstrogen Östradiol-17ß-valerat (EV) ein Langzeitexperiment durchzuführen, um die Zeitabhängigkeit verschiedener Gallenparameter zu untersuchen.

4.2.2.1. Abhängigkeit des Gallenflusses und der Taurocholatsekretion von der Behandlungsdauer

Die s.c. Applikation von EV in therapeutischen Dosen verursacht bei Ratten einen sofortigen Wachstumsstillstand ohne jedoch das Lebergewicht zu erhöhen. Alle Parameter wurden deshalb nur auf das Lebergewicht bezogen. Aus Abbildung 6 A ist zu entnehmen, daß EV nach einmaliger Gabe eine moderate Cholestase erzeugt, die sich auch bei Fortsetzung der Behandlung über 20 Wochen nicht weiter verstärkt. Dies gilt sowohl für den basalen Gallenfluß wie auch für den maximal Taurocholat-stimulierten Fluß.

Nach TC-Infusionsraten, welche die maximale Sekretionskapazität der Leber übersteigen [350 nmol/(min·g)] , kommt es nach 1 Woche EV-Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung der TC-Konzentration in der Galle (Abbilung 6 B), nach 3 Wochen jedoch zu einer signifikanten Erniedrigung, ohne weitere Änderung bis 20 Wochen. Die Sekretionsrate ist demzufolge nach 1 Woche nur leicht und nach 3-20 Wochen stark

erniedrigt. Die Ergebnisse nach einmaliger EV-Behandlung zeigen eine gewisse Analogie zur Ethinylöstradiol-Cholestase, wo ebenfalls die Cholestase mit einer Erhöhung der TC-Konzentration und mit einer Sekretionshemmung verbunden war. Ab 3 Wochen Behandlungsdauer ändert sich das Bild. Die Leber ist nicht mehr in der Lage diese hohe TC-Konzentration in der Galle zu halten, was bei unveränderter Cholestase zu einem weiteren Abfall der Sekretion führt. Dies erinnert mehr an die Befunde der ANIT-Cholestase mit erhöhter Permeabilität des Gallentraktes, wenn auch das Ausmaß der Veränderungen wesentlich bescheidener ausfällt.

4.2.2.2. Abhängigkeit der Sucrose-Clearance von der Behandlungsdauer

Wie in Kapitel 4.2.1.3. ausgeführt, ist wegen seiner Flußabhängigkeit weniger das Galle/Perfusat - Konzentrationsverhältnis als vielmehr die Clearance eines inerten Moleküls ein zuverlässiger Indikator für die Permeabilität des parazellulären Weges. Abbildung 7 zeigt die Zeitabhängigkeit des Gallenflusses und der Sucrose-Clearance unter basalen Bedingungen, d.h. ohne Gallensäurestimulation (Abb. 7 A) und unter Bedingungen der maximalen TC-Cholerese (Abb. 7 B). Aus beiden Abbildungen ist übereinstimmend zu entnehmen, daß die Cholestase unabhängig von der Behandlungsdauer ist, während für die Sucrose-Clearance eine Zeitabhängigkeit zu erkennen ist. Erst nach 3 Wochen EV-Behandlung signalisiert eine signifikant erhöhte Sucrose-Clearance eine moderate Permeabilitätserhöhung des parazellulären Weges, ohne jedoch den Gallenfluß zu beeinträchtigen. Dies bestätigt Ergebnisse von Krell et al. (71), die bei der Zeitabhängigkeit der ANIT-Cholestase zuerst Permeabilitätsänderungen durch erhöhte Sucrose- und Phosphat-Clearance sowie erniedrigte Gallekonzentrationen von TC und BSP feststellten, ohne daß dies zunächst Auswirkungen auf den Gallenfluß gehabt hätte. Dies bestätigt aber auch die eigene Hypothese in doppelter Hinsicht. Erstens tritt zuerst die

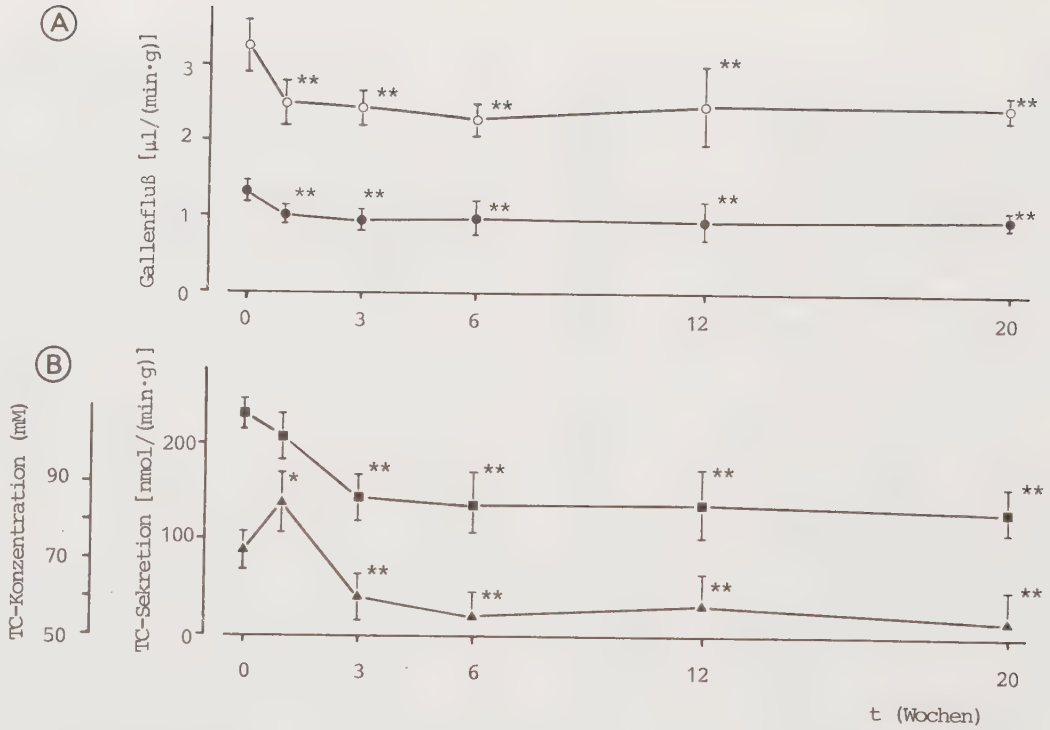

Abbildung 6:

Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit Östradiolvalerat des basalen (●) und maximalen (○) Gallenflusses, sowie die Taurocholat-(TC)-Konzentration (▲) in der Galle und die maximale TC-Sekretionsrate (■). Angegeben sind die Mittelwerte + SD von je 10 Tieren. Statistische Angaben (Dunnetts Test) beziehen sich auf die Kontrolltiere (0 Wochen). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Cholestase und erst dann die Permeabilitätserhöhung auf, und zweitens ändert die moderate Permeabilitätserhöhung nichts am Gallenfluß. Damit kann die erhöhte Permeabilität des Gallentraktes bei der Östrogen-Cholestase, wie von anderen Autoren berichtet (52,54,62,63), nicht die Ursache sondern nur die Folge dieser Cholestase sein.

4.2.2.3. Parazellulärer Reflux von konjugiertem BSP

Wie in Kapitel 4.2.1.2. angedeutet, ist bei erhöhten Konzentrationen der konjugierten Gallensäure Taurocholat (TC) im Perfusat nicht zu unterscheiden, ob TC von der Leber nicht aufgenommen wurde oder über eröffnete parazelluläre Wege aus der Galle zurückfließt. Bei Verwendung des freien Sulfobromophthaleins, das in der Leberzelle mit Glutathion konjugiert und dann in die Galle ausgeschieden wird, besteht die Möglichkeit über die Trennung des freien vom konjugierten BSP im Perfusat einen Rückfluß aus der Galle nachzuweisen (71,72).

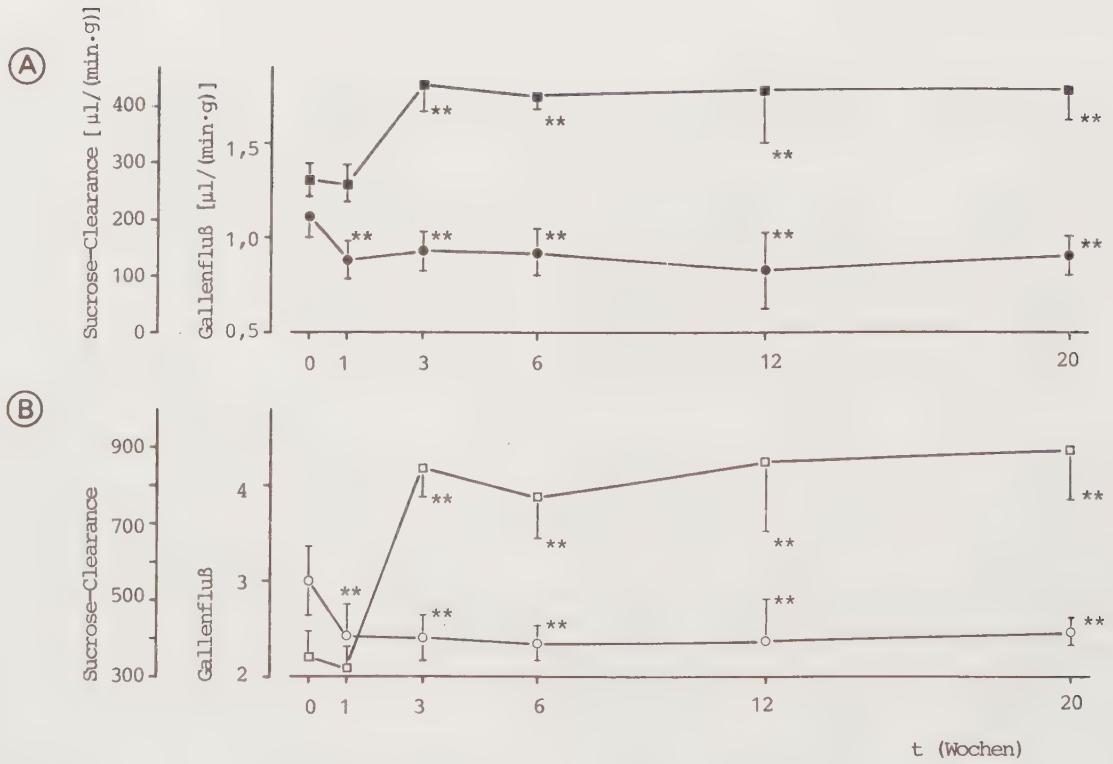

Abbildung 7:

Abhängigkeit von der Östradiolvalerat-Behandlungsdauer des Gallenflusses (Kreise) und der Sucrose-Clearance (Quadrate) unter basalen Bedingungen (geschlossene Symbole) bzw. unter Taurocholat-Cholerese (offene Symbole). Angegeben sind die Mittelwerte ± SD von je 5 Tieren. Statistische Angaben (Dunnetts Test) beziehen sich auf die Kontrollen (0 Wochen). ** $p < 0{,}01$

Aus Tabelle 7 ist zu entnehmen, daß eine Langzeitbehandlung (3-20 Wochen) mit Östradiolvalerat die Gleichgewichtskonzentration von konjugiertem BSP im Perfusat signifikant erhöht, während sich die kurzzeitig behandelten Tiere (1 Woche) von den Kontrollen nicht unterscheiden. Mit großer Wahrscheinlichkeit kommt diese Erhöhung durch einen erleichterten parazellulären Reflux von BSP·SG zustande. Die

Tabelle 7: Halbwertszeit von BSP und Gleichgewichtskonzentration von BSP·SG im rezirkulierenden Perfusat in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit Östradiolvalerat.

Nach einer offenen Vorperfusion von 40 min wurde auf das rezirkulierende Medium (200 ml), das 60 mg BSP/kg KG (75 µM) enthielt, umgeschaltet. Die Halbwertszeit (HWZ) für BSP im Perfusat wurde für die initiale Aufnahmephase in den ersten 2 min rezirkulierender Perfusion ermittelt, die Gleichgewichtskonzentration entspricht dem Durchschnittswert im Perfusat nach 110 - 130 min. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD von je 5 Tieren.

	HWZ (min)	BSP·SG (µM)
Kontrollen	5,1 ± 0,5	9,3 ± 2,3
EV 1	5,1 ± 0,3	11,3 ± 4,0
EV 3	5,3 ± 0,7	18,5 ± 5,8**
EV 20	5,4 ± 0,8	26,8 ± 8,2**

** $p < 0,01$ (Dunnett)

Halbwertszeit für BSP im Perfusat ist bei allen Tieren gleich. Dies bestätigt Ergebnisse der EE-Behandlung, wo für Gallensäuren ebenfalls keine Hemmung der Aufnahme gefunden wurde (Tab. 5).

All diese Befunde sprechen für eine erhöhte Permeabilität des parazellulären Weges unter der Langzeitbehandlung von EV und stützen damit die Hypothese, daß es sich dabei um eine Folgeerscheinung der Östrogen-Cholestase handelt.

4.3. Der parazelluläre Weg

Der seit Forker (37) allgemein akzeptierte parazelluläre Eintritt inerter Moleküle in die Galle wurde in jüngster Zeit durch Befunde in Frage gestellt, die auf einen vesikulären Transport durch den Hepatozyten sowohl für Inulin (15,41) als auch für Sucrose (16) hinwiesen. Aus diesem Grund wurde versucht mit Hilfe der isoliert perfundierten Rattenleber zwischen einem trans- und einem parazellulären Weg in die Galle für Sucrose zu differenzieren.

4.3.1. Der zeitliche Verlauf der biliären und intrazellulären Sucrose-Konzentration

Einen ersten Hinweis darauf, über welchen Weg die Sucrose in die Galle gelangt, sollte durch die Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der intrazellulären und biliären Sucrose-Konzentration erhalten werden (Abb. 8). Der Sucrose-Gehalt der Leber steigt innerhalb von 20 min auf einen Maximalwert an, der sich nach weiterer Perfusion bis 60 min nicht ändert (Abb. 8 A). Im Gegensatz dazu erreicht die Sucrose in der Galle, wie in Abb. 8 B an einem exemplarischen Beispiel gezeigt, bereits nach weniger als 10 min ihre Gleichgewichtskonzentration. Der direkte Vergleich mit HTO (nicht eingezeichnet), zeigt eine geringfügige Verzögerung des größeren Moleküls Sucrose.

Diese Ergebnisse, daß die Sucrose in der Galle bereits die Gleichgewichtskonzentration erreicht hat, während sie intrazellulär aber erst bei 50 % des Maximalwertes ist, deuten auf einen bevorzugt parazellulären Transport hin; eine Argumentation wie sie auch Forker (37) bei seinen Versuchen am Ganztier benutzte. Bei einem reinen parazellulären Transport müßte sich das Absinken der Sucrose in der Galle gleich wie der Einstrom verhalten. Wie Abb. 8 B jedoch zeigt, befinden sich 10 min nach Umschaltung auf Sucrose-freies Medium immer noch $\sim$25 % der Gleichgewichtskonzentration in der Galle. Setzt man die Perfusion fort, so ist ein linearer Abfall der Sucrose ab ca. 100 min festzustellen. Postuliert man, daß dieser Teil der Sucrose transzellulär transportiert wird und extrapoliert auf die Umschaltung zurück;so erhält man 31 µM ($\hat{=}$ 17 %) als transzellulären Anteil an der biliären Sucrose-Konzentration.

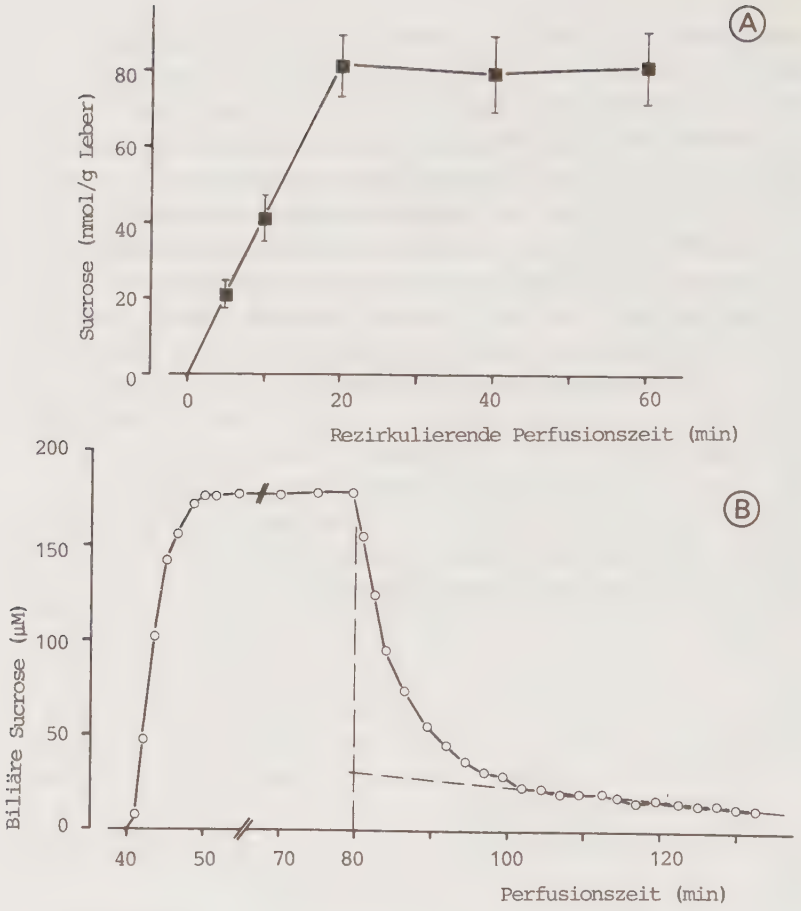

Abbildung 8:

A) Abhängigkeit des Sucrose-Gehalts der Leber von der rezirkulierenden Perfusionszeit. Vor Entnahme der Leber wurde sie für 3 min mit Sucrose-freiem Medium gespült. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD von je 4 Tieren.

B) Beispiel für den zeitlichen Verlauf der biliären Sucrose-Konzentration. Nach einer Vorperfusion von 40 min wurde die Leber für weitere 40 min mit Sucrose-haltigem Medium rezirkulierend und anschließend 60 min offen (Sucrose-frei) perfundiert. Eingezeichnet ist die Extrapolation des linearen Abfalls der Sucrose-Konzentration auf den Zeitpunkt der Umschaltung (= 31 µM).

4.3.2. Der transzelluläre Transport der Sucrose

Entscheidend für die Extrapolationsmethode ist, ob es gelingt den Nachweis dafür zu erbringen, daß dieser lineare Abfall der Sucrose-Konzentration auch wirklich ein Maß für den transzellulären Sucrose-Transport darstellt. Zu diesem Zweck wurde deshalb der transzelluläre Anteil bei unterschiedlichen intrazellulärem Sucrose-Gehalt bestimmt. Schaltet man auf Sucrose-freies Medium nach nur 10 min rezirkulierender Perfusion um, so ist der intrazelluläre Anteil nur halb so groß wie bei einer 40-minütigen rezirkulierenden Perfusion (Abb. 8 A), während die biliäre Sucrose-Konzentration nahezu identische Werte erreicht (Abb. 9 A). Diese durch Extrapolation ermittelten Anteile von 15 µM (10 min) bzw. 31 µM (40 min) unterstützen die These, daß es sich dabei um transzelluläre Anteile handelt.

In die gleiche Richtung weisen die Ergebnisse bei Änderung des parazellulären Anteils (Abb. 9 B).

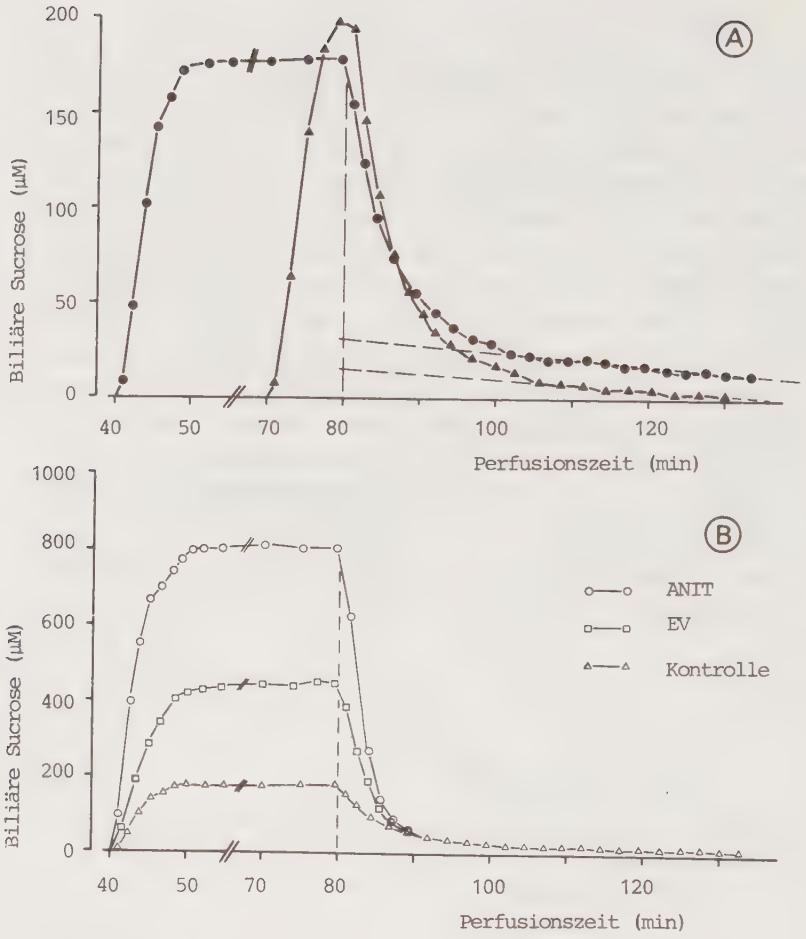

Abbildung 9:

A) Zeitabhängigkeit der biliären Sucrose-Konzentration. Nach einer offenen Vorperfusionsphase von 40 bzw. 70 min wurde die Leber 40 bzw. 10 min rezirkulierend mit Sucrose-haltigem Medium und anschließend 60 min offen (Sucrose-frei) perfundiert. Extrapolation auf den Zeitpunkt der Umschaltung ergab 31 µM (40 min) bzw. 15 µM (10 min).

B) Zeitabhängigkeit der biliären Sucrose-Konzentration für eine 40-minütige rezirkulierende Perfusion mit anschließendem Wechsel auf Sucrose-freies Medium. Vergleich einer 12 Wochen EV- und 9 h ANIT-behandelten Rattenleber mit einer Kontrolle.

Vergleicht man Kontrollen mit EV- bzw. ANIT-behandelten Tieren, so ist die Sucrose-Konzentration in der Galle bei den Lebern der behandelten Tiere signifikant erhöht, jedoch der intrazelluläre Sucrose-Gehalt und die durch Extrapolation abgeschätzte transzelluläre Menge nahezu identisch (Tab. 8).

Tabelle 8: Vergleich zwischen den berechneten transzellulären Sucrose-Anteilen in der Galle und dem Sucrose-Gehalt gleichlang rezirkulierend perfundierter Lebern von Kontrolltieren, 12 Wochen Östradiolvalerat- und 9 h ANIT-behandelten Tieren. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD von je 4 Tieren.

		Transzellulärer Sucrose-Anteil (µM)	Sucrose-Gehalt der Leber (nmol/g Leber)
Kontrollen	10 min	15,2 ± 1,5	41,6 ± 6,3
Kontrollen	40 min	29,3 ± 1,5	78,1 ± 10,0
EV	40 min	33,8 ± 8,2	88,7 ± 12,8
ANIT	40 min	30,8 ± 2,9	86,2 ± 15,2

Einen weiteren Beweis für die Richtigkeit der aufgestellten Hypothese liefert die Korrelation zwischen der Sucrose-Konzentration in der Galle nach 40 - 60-minütiger Sucrose-freier Perfusion und dem Sucrose-Gehalt der Leber (Abb. 10). Die nach Beendigung jeder Perfusion (Kontrollen, EV, ANIT) gemessenen Werte ergaben zusammen mit den extrapolierten Werte aus Tabelle 8 nach linearer Regression einen Korrelationskoeffizienten von 0,952.

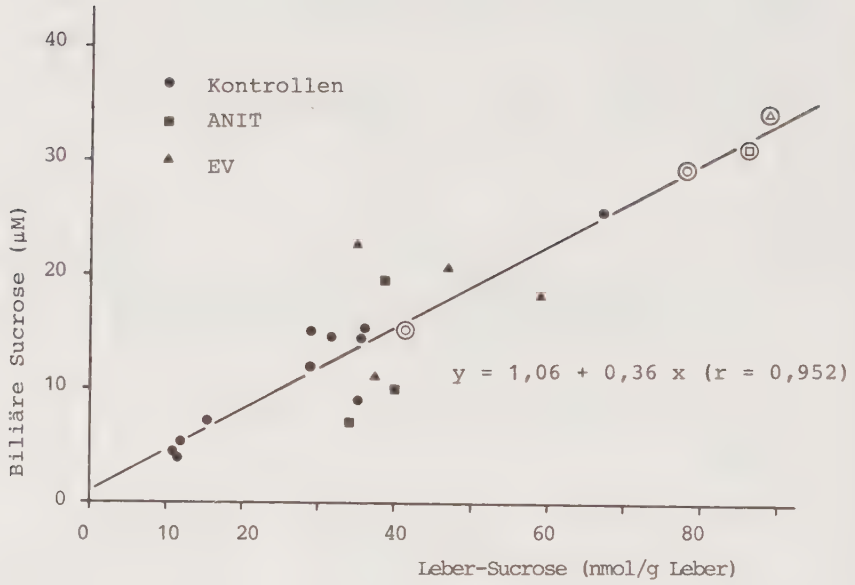

Abbildung 10:

Korrelation zwischen der biliären Sucrose und dem Lebergehalt an Sucrose für Kontrollen, 12 Wochen Östradiolvalerat- bzw. 9 h ANIT-behandelten Tieren. Es wurden nur Werte von den Perfusionen genommen, die nach der rezirkulierenden Perfusion mindestens 40 min offen perfundiert wurden und damit nach dem Postulat nur noch transzellulär transportierte Sucrose in der Galle hatten (geschlossene Symbole). Zusätzlich sind die Mittelwerte aus Tabelle 8 eingezeichnet (offene Symbole), die bei der linearen Regression jeweils vierfach gewichtet wurden.

Mit diesen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, daß der lineare Abfall der biliären Sucrose-Konzentration, der ab ca. 20 min nach Umschaltung auf Sucrose-freies Medium beobachtet wird, den transzellulären Transport der Sucrose repräsentiert. Mit der Extrapolation zurück auf den Umschaltzeitpunkt kann der transzelluläre Anteil an der Gesamtsucrosekonzentration in der Galle abgeschätzt werden. Für unbehandelte Tiere (basaler Gallenfluß) wird von der gesamten Konzentration von 189 $\pm$ 24 µM ca.16 % (29,3 $\pm$ 1,5 µM) transzellulär transportiert und ca. 84 % parazellulär. Cholestatika erhöhen durch die Permeabilitätsänderungen den parazellulären Einstrom der Sucrose in die Galle, wovon die transzellulär transportierte Menge absolut gesehen jedoch nicht betroffen ist.

5. D I S K U S S I O N

5.1. Leberperfusionsmethode

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Leistungsfähigkeit des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber überprüft. Unter der Voraussetzung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung, d.h. daß ein Perfusatfluß von > 3 ml/(min·g) aufrecht erhalten wird, kann dieses System mehr als 2 h verwendet werden. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, daß offene und rezirkulierende Perfusionen keine wesentlichen Unterschiede zeigen. Das höhere und langsam steigende Lactat/Pyruvat-Verhältnis (Abb. 4) bzw. der etwas größere LDH-Efflux (Abb. 3) signalisieren eine schlechter werdende Sauerstoffversorgung und eine schnellere Zerstörung von Hepatozyten bei rezirkulierender Perfusion. Der Verlauf des Gallenflusses und die Gallensekretionsparameter sind jedoch in beiden Systemen identisch. Man kann daher annehmen, daß die erwähnten Differenzen auf die Gallebildung keinen Einfluß haben. Einerseits ist der Sauerstoffbedarf für die Aufnahme und Sekretion von Gallensäuren im Vergleich zum gesamten Sauerstoffverbrauch der Leber sehr gering (81), andererseits wird die Leber auch in vivo nicht in allen Bereichen gleichermaßen optimal durchblutet und mit Sauerstoff versorgt (2).

Die Leistungsfähigkeit eines Modells beurteilt man am besten im Vergleich mit anderen, etablierten Systemen. Hierzu bieten sich Perfusionsmethoden mit speziell zugesetzten Sauerstoff-Trägern wie Erythrozyten oder fluorierten Kohlenwasserstoffen sowie das narkotisierte Ganztier an. In den folgenden Punkten werden eigene Ergebnisse mit den Literaturdaten anderer Systeme verglichen:

1. Der Gallenfluß der Hämoglobin-frei isoliert perfundierten Rattenleber sinkt im offenen und im rezirkulierenden Betrieb linear ab (1,20 - 1,45 µl/(min·g) nach 30 min,

1,05 - 1,15 µl/(min·g) nach 60 min und 0,80 - 0,90 µl/(min·g) nach 120 min). Er liegt damit im Bereich anderer Systeme [1,21 - 1,5o µl/(min·g) nach 30 min (25, 82, 83) und 0,80 ± 0,22 µl/(min·g) nach 60 min (25)].

2. LDH wird erst nach einer Perfusionszeit von > 120 min in größeren Mengen ins Perfusat abgegeben.

3. Das Lactat/Pyruvat-Verhältnis im effluenten Perfusat liegt zwischen 5 - 7, was für eine ausreichende Sauerstoffversorgung spricht. In anderen Systemen wurden gleiche Werte gemessen (84).

4. Der maximale Gallendruck (17,4 ± 0,7 cm H_2O) war identisch mit Ergebnissen von Erythrozyten-haltigen Perfusionsmedien (16 - 20 cm H_2O) (85,86) und war höher wie im Fluorocarbon-haltigen System (11,5 ± 0,9 cm H_2O) (25).

5. Die maximale Konzentration von Taurocholat in der Galle (71,5 ± 4,8 mM) und die maximale Sekretionsrate [239 ± 11 nmol/(min·g) = 860 nmol/(min·100 g KG)] entsprachen den beschriebenen Werten am Ganztier [750 - 1000 nmol/(min·100 g KG)] (17,48,54).

6. Die Galle/Perfusat - Verhältnisse für Sucrose (0,262 ± 0,032 nach 1 h) waren mit anderen Perfusionssystemen vergleichbar (0,21 - 0,29) (25,38). In Gallenfistel-Ratten sind diese Werte (0,11 - 0,19) auf Grund des höheren Gallenflusses kleiner (33,37,52,62,87).

Diese Vergleiche zeigen, daß sich das Modell der hämoglobinfrei isoliert perfundierten Rattenleber ähnlich verhält wie Perfusionssysteme mit zugesetzten Sauerstoffträgern oder das narkotisierte Ganztier. Die entscheidenden Vorteile liegen jedoch in seiner einfacheren Handhabung und seinen unkomplizierten Messungen im Perfusat, das ohne störende Blutzellen bzw. emulgierte fluorierte Kohlenwasserstoffe in nahezu alle Tests direkt einsetzbar ist. Dies erklärt auch die zunehmende Verbreitung dieses Systems.

5.2. Die Östrogen-Cholestase

5.2.1. Die Ethinylöstradiol-induzierte Cholestase

Es wurden die mögliche Beteiligung von Permeabilitätsänderungen des parazellulären Weges an der Pathogenese der Ethinylöstradiol-induzierten intrahepatischen Cholestase untersucht. Dabei wurden Lebern von EE-behandelten Ratten mit denen von ANIT-behandelten Tieren verglichen. Für die ANIT-Cholestase wurde die erhöhte Permeabilität des Gallentraktes bereits gezeigt (71,75). Diese erhöhte biliäre Permeabilität sollte einen Reflux von Gallenbestandteilen über den parazellulären Weg verursachen. Somit sollte die Konzentration aller in die Galle sezernierten Stoffe erniedrigt sein, was durch die geringere osmotische Wirkung einen erniedrigten Gallenfluß zur Folge haben sollte. Diese theoretischen Überlegungen konnten durch die Ergebnisse der ANIT-Cholestase in dieser Arbeit, wie auch in früheren Untersuchungen geschehen (71,75), voll bestätigt werden. Im Gegensatz dazu sind die Resultate der EE-behandelten Tiere nicht mit einer erhöhten Permeabilität des parazellulären Weges vereinbar. Ethinylöstradiol-Tiere sind sogar in der Lage, erhöhte Konzentrationen von Taurocholat in der Galle zu halten (Tabelle 5). Dies wurde auch am Ganztier für Gallensäuren (17) und für BSP (53) gezeigt. Auch die nicht erhöhte Perfusat-Konzentration von Taurocholat spricht gegen einen parazellulären Reflux von Gallenbestandteilen.

Die Bestimmung der Galle/Plasma-Verhältnisse und Clearance-Raten inerter Moleküle wie Sucrose, Inulin oder Polyethylenglykol, ist eine allgemein gebräuchliche Methode um Permeabilitätsänderungen des Gallentraktes nachzuweisen (33,39,52, 54,62,71,74,88-90). Erhöhte Galle/Perfusat - Verhältnisse von Sucrose und Inulin bei EE-Cholestase konnten jedoch mit der Erniedrigung des Gallenflusses erklärt werden, wie die mit den Kontrollen nahezu identischen Clearance-Raten beweisen (Tabelle 6). Diese Interpretation der Ergebnisse wird durch die theoretische Analyse nach Forker (52,76)

und Wheeler et al. (77) gestützt. Die berechneten Reflektionsfaktoren bzw. Permeabilitätskoeffizienten für die Diffusion waren für Kontrollen und EE-behandelten Tiere fast gleich, während sich diese Koeffizienten für die ANIT-behandelten Tiere stark unterschieden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine erhöhte biliäre Permeabilität als Primärereignis der Ethinylöstradiol-Behandlung ausgeschlossen werden.

5.2.2. Die Östradiolvalerat-induzierte Cholestase

Mit den Ergebnissen, die an Ethinylöstradiol-behandelten Tieren erhalten wurden, konnten andere Autoren (52,54,62, 63) widerlegt werden, die einen kausalen Zusammenhang zwischen der erhöhten biliären Permeabilität und der Entstehung der Cholestase postulierten. Bei den Befunden dieser Autoren fällt auf, daß sie zwar ebenfalls erhöhte Galle/Plasma-Verhältnisse inerter Moleküle fanden, im Gegensatz zu meinen Ergebnissen jedoch auch erhöhte Clearance-Raten. Diese Erhöhung ist zwar nur gering und in keiner Weise mit dem Ausmaß der Veränderungen bei der ANIT-Cholestase zu vergleichen, signalisiert jedoch eine leicht erhöhte Permeabilität des parazellulären Weges. Diese Tatsache führte uns zu der Hypothese, daß eine solche Permeabilitätsänderung nicht Ursache, sondern Folge der Östrogen-Cholestase sein könnte.

Die kurzzeitige Behandlung von Ratten mit dem Depotöstrogen Östradiol-17ß-valerat brachte zur Ethinylöstradiol-Behandlung analoge Ergebnisse: Nach 1 Woche wurden im Vergleich zu Kontrollen erhöhte Taurocholat-Konzentrationen in der Galle bei gleichzeitig verringerter Sekretion und erniedrigtem Fluß sowie identische Sucrose-Clearance und gleiche Konzentrationen von BSP-Konjugaten im Perfusat beobachtet. Diese Befunde zeigen eine moderate intrahepatische Cholestase ohne Permeabilitätserhöhung des Gallen-

traktes. Setzt man diese Behandlung über längere Zeit fort, so treten nach 3 Wochen alle Symptome einer leicht erhöhten Permeabilität des parazellulären Weges auf. Es kommt zur signifikanten Erniedrigung der Taurocholat-Konzentration in der Galle, wobei die gleichzeitig erhöhten Konzentrationen von TC und konjugiertem BSP im Perfusat eine parazellulären Reflux von Gallenbestandteilen signalisieren. Auch die erhöhte Sucrose-Clearance weist in diese Richtung. Bemerkenswert sind dabei die Tatsachen, daß einerseits der Gallenfluß von diesen Änderungen unberührt bleibt und andererseits die leicht erhöhte Permeabilität auch durch die Verlängerung der Behandlungsdauer auf 20 Wochen nicht verstärkt wird.

Zusammenfassend stützen folgende Befunde die aufgestellte Hypothese:

1. Die Cholestase manifestiert sich vor dem Auftreten der biliären Permeabilitätserhöhung.
2. Die geringfügige Permeabilitätsänderung erniedrigt den Gallenfluß nicht.
3. Eine Fortsetzung der Behandlung mit Östradiolvalerat über 20 Wochen verstärkt die Permeabilitätserhöhung nicht.

Dies spricht auch gegen eine direkte Östrogen-Wirkung auf die "tight junctions", da man andernfalls nicht nur mit therapeutischen Dosen von Östradiolvalerat, sondern gerade bei der extrem hohen Dosierung von Ethinylöstradiol eine solche Wirkung hätte erwarten müssen. Die Befunde sind daher nur durch die Postulierung eines Vermittlers zu erklären. Gallensäuren könnten hierfür als potentielle Anwärter in Frage kommen. Einerseits wurden in dieser Arbeit überhöhte Konzentrationen von Taurocholat sowohl unter EE- wie auch unter kurzzeitiger EV-Behandlung gemessen, andererseits konnten verschiedene Autoren zeigen, daß unterschiedliche Gallensäuren die biliäre Permeabilität für Suc-

rose, Inulin und Lanthan erhöhen (33,88-91).

Die Permeabilitätserhöhung des parazellulären Weges bei der Östrogen-Cholestase ist nicht die Ursache, sondern eindeutig die Folge dieser intrahepatischen Cholestase. Mit der Klärung dieses Problems ist es erstmals gelungen, den experimentellen Nachweis für eine Sekundärschädigung durch eine intrahepatische Cholestase zu liefern.

5.3. Der parazelluläre Weg

Den ersten Hinweis für den parazellulären Eintritt inerter Moleküle (Sucrose, Inulin) in die Galle stammte von Forker (37). Seine Hypothese wurde allgemein akzeptiert, obwohl sie durch ihn selbst wie auch durch andere Autoren (33,34, 38,39) nur indirekt bestätigt werden konnte. In diesselbe Richtung deuteten Ergebnisse von Graf und Peterlik (35), die für anorganische Kationen (Na^+, K^+) und für Wasser eine bevorzugt parazelluläre Bewegung nachwiesen, sowie von Bradley und Herz (36), die zeigen konnten, daß die parazelluläre Barriere ("tight junctions") nach Molekülgröße aber auch nach Ladung trennt. Dies wurde auch in dieser Dissertation bestätigt (4.1.4.). In jüngster Zeit wurde jedoch über Ergebnisse berichtet, die einen vesikulären Transport durch den Hepatozyten sowohl für Inulin (15,41) als auch für Sucrose (16,41) nahelegten. Aus diesen Gründen schien es notwendig, ausgehend von Experimenten von Forker (37), einen neuen Lösungsversuch dieses Problems mit Hilfe der isoliert perfundierten Leber zu unternehmen. Der beobachtete Verlauf des Sucrosegehalts in der Leber und in der Galle bestätigt Forker insofern, als das Gleichgewicht in der Galle vor dem in der Leber erreicht wurde. Es steht jedoch im Gegensatz zu seinen Ergebnissen, da er für die Leber selbst nach 5 h noch keine Gleichgewichtslage erreicht sah. Die in dieser Arbeit beobachtete Sättigung des Sucrosegehalts der Leber stützt die These, die für die transzelluläre Passage der Leber einen vesikulären Transport vorschlägt. Eine einfache Diffusion in die Leber ist aus diesen Gründen auszuschließen.
Entscheidend für das Problem des parazellulären Weges war jedoch der zeitliche Verlauf der Sucrose in der Galle nach dem Absetzen im Perfusat. Der biphasische Verlauf, mit einem schnellen Abfall innerhalb der ersten 10 min und einem späteren eher linearen Absinken der Sucrose-Konzentration, legte eine Beteiligung von para- und transzellulärem Weg nahe. Da außer den genannten kein weiterer Zugang zur Galle

möglich ist, so bedingt die eindeutige Zuordnung eines Teils der Sucrose-Konzentration in der Galle zu einem Transportweg automatisch, daß der Rest der Sucrose über den anderen Weg in die Galle gelangt. Diese Argumentation ist deshalb zulässig, da für die Annahme zweier unterschiedlich schnell austauschender intrazellulärer Pools keine Veranlassung besteht:

1. Gegen die schnelle Diffusion neben einem langsamen Vesikeltransport spricht sowohl die generelle Impermeabilität von Membranen für Disaccharide wie auch die Sättigungskinetik (Abb. 8 A).
2. Gegen die parallele Existenz zweier vesikulärer Pools sprechen Experimente mit Colchicin, die zeigten, daß bei totaler Hemmung des Vesikeltransports die Sucrose-Konzentration in der Galle nur geringfügig absinkt (92).

Aus diesen Gründen wurde versucht nachzuweisen, daß es sich bei der Sucrose, die nach mehr als 20-minütiger offener Perfusion noch in der Galle ist, um transzellulär transportierte Moleküle handelt. Folgende, experimentell abgesicherte Argumente stützen diese These:

1. Bei Halbierung des intrazellulären Sucrose-Gehalts der Leber ist der fragliche Anteil der biliären Sucrose ebenfalls halbiert (Abb. 9 A).
2. Bei Erhöhung des parazellulären Anteils ist die Sucrose-Konzentration der Galle erhöht, die absolute Menge an transzellulär transportierter Sucrose jedoch unverändert (Abb. 9 B, Tabelle 8).
3. Es besteht eine ausgezeichnete Korrelation zwischen den gemessenen bzw. extrapolierten und als transzellulär postulierten biliären Sucrose-Konzentrationen einerseits und dem entsprechenden Sucrose-Gehalt der Leber andererseits (Abb. 10).
4. Die Hemmung des vesikulären Transports senkt die biliäre Sucrose-Konzentration geringfügig ab (92).

Diese Argumente sprechen eindeutig dafür, daß es sich bei dem langsam absinkenden Teil der biliären Sucrose-Konzentration um transzellulär transportierte Moleküle handelt, während der überwiegende Teil der Sucrose (>80 %) über parazelluläre Wege sehr schnell ausgetauscht wird.

Damit gelang es, die Streitfrage, ob trans- oder parazellulärer Transport die biliäre Clearance der Sucrose bestimmt, zweifelsfrei zu lösen und erstmals eine Methode anzugeben, mit der die quantitative Abschätzung des Beitrags beider Wege möglich ist.

6. L I T E R A T U R

1. Evans WH. (1980)
   Biochim Biophys Acta 604: 27 - 64

2. Boyer JL. (1980)
   Physiol Rev 60: 303 - 26

3. Gumucio JJ, Miller DL. (1981)
   Gastroenterology 80: 393 - 403

4. Groothuis GM, Hardonk MJ, Keulemans KP, et al. (1982)
   Am J Physiol 243: G 455 - 62

5. Groothuis GM, Weitering JG, Keulemans KP, et al. (1983)
   Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 322: 310 - 8

6. Schwarz LR, Burr R, Schwenk M, Pfaff E, Greim H. (1975)
   Eur J Biochem 55: 617 - 23

7. Van Dyke RW, Stephens JE, Scharschmidt BF. (1982)
   Am J Physiol 243: G 484 - 92

8. Schwarz LR, Barth CA. (1979)
   Hoppe-Seylers Z Physiol Chem 360: 1117 - 20

9. Reichen J, Paumgartner G. (1976)
   Am J Physiol 231: 734 - 42

10. Iga T, Klaassen CD. (1982)
    Biochem Pharmacol 31: 211 - 6

11. Strange RC, Cramb R, Hayes JD, Percy-Robb IW. (1977)
    Biochem J 165: 425 - 29

12. Jones AL, Schmucker DL, Mooney JS, et al. (1979)
    Lab Invest 40: 512 - 7

13. Garfield SA, Suchy FJ, Hung JT, Balistrari WF. (1982)
    J Cell Biol 95: 12052 (Abstr.)

14. Renston RH, Jones AL, Christiansen WD, et al. (1980)
    Science 208: 1276 - 8

15. Lorenzini I, Ilter T, Meier P, Boyer JL. (1982)
    Hepatology 2: 737 (Abstr.)

16. Graf J. (1983)
Am J Physiol 244: G 233 - 46

17. Gumucio JJ, Valdivieso VD. (1971)
Gastroenterology 61: 339 - 44

18. Forker EL. (1977)
Annu Rev Physiol 39: 323 - 47

19. Balabaud C, Kron KA, Gumucio JJ. (1977)
J Lab Clin Med 89: 393 - 9

20. Baker AL, Wood AB, Moossa AR, Boyer JL. (1979)
J Clin Invest 64: 312 - 20

21. Latham PS, Kashgarian M. (1979)
Gastroenterology 76: 988 - 96

22. Blitzer BL, Boyer JL. (1978)
J Clin Invest 62: 1104 - 8

23. Erlinger S. (1981)
Hepatology 1: 352 - 9

24. Erlinger S. (1982)
Am J Physiol 243: G 243 - 7

25. Van Dyke RW, Stephens JE, Scharschmidt BF. (1982)
J Clin Invest 70: 505 - 17

26. Anwer MS, Hegner D. (1983)
Am J Physiol 244: G 116 - 24

27. Hardison WGM, Wood CA.(1978)
Am J Physiol 235: E 158 - 64

28. Bichara M, Paillard M, Leviel F, Gardin JP. (1980)
Am J Physiol 238: F 445 - 51

29. Kinsella JL, Aronson PS. (1980)
Am J Physiol 238: F 461 - 9

30. Reckenwaldt D, Hess B. (1977)
FEBS Lett 76: 25 - 8

31. Foster DL, Fillingame RH. (1979)
J Biol Chem 254: 8230 - 6

32. Schultz SG. (1977)
Yale J Biol Med 50: 99 - 113

33. Layden TJ, Elias E, Boyer JL. (1978)
J Clin Invest 62: 1375 - 85

34. Boyer JL, Elias E, Layden TJ. (1979)
Yale J Biol Med 52: 61 - 7

35. Graf J, Peterlik M. (1976) in: The hepatobiliary system (Hrsg.: Taylor W.) New York: Plenum Press, 43 - 58

36. Bradley SE, Herz R. (1978)
Am J Physiol 235: E 570 - 6

37. Forker EL. (1970)
Am J Physiol 219: 1568 - 73

38. Javitt NB, Dillon D, Kok E, Wachtel N. (1979) in: The liver, quantitative aspects of structure and function (Hrsg.: Preisig R, Bircher J.) Aulendorf: Editio Cantor, 197 - 202

39. Elias E, Hruban Z, Wade JB, Boyer JL. (1980)
Proc Natl Acad Sci USA 77: 2229 - 33

40. Blitzer BL, Boyer JL. (1982)
Gastroenterology 82: 346 - 57

41. Ilter T, Ng OC, Boyer JL. (1983)
Gastroenterology 84: 1194 (Abstr.)

42. Ockner RK, Davidson CS. (1967)
N Engl J Med 226: 331 - 4

43. Kreek MJ. (1969) in: Metabolic effects of gonadal hormones and contraceptive steroids (Hrsg.: Salhanick HA, Kipnis DM, Wiele RV.) New York: Plenum Press, 40 - 58

44. Schaffner F. (1979) in: Problems in intrahepatic cholestasis (Hrsg.: Gentilini P, Popper H, Sherlock S, Teodori U.) Basel: Karger, 166 - 71

45. Kern F. (1978)
Gastroenterology 75: 512 - 22

46. Plaa GL, Priesly BG. (1977)
Pharmacol Rev 28: 207 - 73

47. Keeffe EB, Scharschmidt BF, Blankenship NM, Ockner RK. (1979)
J Clin Invest 64: 1590 - 8

48. Simon FR, Gonzalez M, Sutherland E, et al. (1980)
J Clin Invest 65: 851 - 60

49. Kreek MJ, Peterson RE, Sleisenger MH, Jeffries GH. (1969)
Proc Soc Exp Biol Med 131: 646 - 50

50. Kleiner GJ, Kresch L, Arias IM. (1965)
N Engl J Med 273: 420 - 3

51. Mueller MN, Kappas A. (1964)
J Clin Invest 43: 1905 - 14

52. Forker EL.(1969)
J Clin Invest 48: 654 - 50

53. Hoenig V. (1981)
Pharmacol Res Commun 13: 903 - 8

54. Harkavy M, Javitt NB. (1969) in: Metabolic effects of gonadal hormones and contraceptive steroids (Hrsg.: Salhanick HA, Kipnis DM, Wiele RV.) New York: Plenum Press, 11 - 18

55. Gumucio JJ, Accatino L, Macho AM, Contreras A. (1973)
Gastroenterology 65: 651 - 7

56. Davis RA, Kern F, Showalter R, et al. (1978)
Proc Natl Acad Sci USA 75: 4130 - 4

57. Schwarz LR, Schwenk M, Greim H. (1977)
Acta Hepato-Gastroenterol 24: 31 - 6

58. Boyer JL. (1978)
Viewpoints Dig Diseases 10: 264 - 7

59. Popper H. (1981)
Hepatology 1: 187 - 91

60. Paumgartner G. (1981)
Hepatology-Rapid Lit Rev XI: pp IX - XIII

61. Erlinger S. (1982)
Gastroenterol Clin Biol 6: 500 - 8

62. Elias E, Iqbal S, Hickey A, Coleman R. (1981)
Clin Sci 61: 5 (Abstr.)

63. Boyer JL, La Garde S, Ng OC, Groszmann R. (1981)
The American Association for the Study of Liver Diseases, 32nd Annual Meeting, November 1981: 8 c (Abstr.)

64. Jaeschke H, Krell H. (1983)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol Suppl. 322: R 55 (Abstr.)

65. Jaeschke H, Krell H. (1983)
Hoppe-Seylers Z Physiol Chem 364:343 (Abstr.)

66. Jaeschke H, Krell H, Pfaff E. (1983)
Gastroenterology 85 in press

67. Scholz R, Hansen W, Thurman RG. (1973)
Eur J Biochem 38: 64 - 72

68. Sies H. (1978) in: Methods in Enzymology 52
(Hrsg.: Fleischer S, Packer L) New York: Academic Press, 48 - 59

69. Krebs HA, Henseleit K. (1932)
Hoppe-Seylers Z Physiol Chem 210: 33 - 66

70. Bergmeyer HU. (1970) in: Methoden der enzymatischen Analyse, Weinheim: Verlag Chemie

71. Krell H, Hoeke H, Pfaff E. (1982)
Gastroenterology 82: 507 - 14

72. Hoeke H. (1980) Biochem. Dissertation, Tübingen

73. Dunnett CW. (1964)
Biometrics 20: 482 - 91

74. Strasberg SM, Petrunka CN, Ilson RG, Paloheimo JE. (1979)
Gastroenterology 76: 259 - 66

75. Krell H, Hoeke H, Pfaff E, Metz J. (1979) in: Communication of liver cells (Hrsg.: Popper H, Bianchi L, Gudat F, Reutter F.) Lancaster: MTP Press, 361 (Abstr.)

76. Forker EL. (1967)
J Clin Invest 46: 1189 - 95

77. Wheeler HO, Ross ED, Bradley SE. (1968)
Am J Physiol 214: 866 - 74

78. Renkin EM. (1954)
J Gen Physiol 38: 225 - 40

79. Kedem O, Katchalsky A. (1958)
Biochim Biophys Acta 27: 229 - 46

80. Patlak CS, Goldstein DA, Hofmann JF. (1963)
J Theor Biol 5: 426 - 42

81. Scharschmidt BF, Van Dyke RW, Stephens JE, et al. (1981)
Hepatology 1: 544 a (Abstr.)

82. Tavoloni N, Reed JS, Boyer JL. (1978)
Am J Physiol 234: E 584 - 92

83. Boyer JL. (1971)
Am J Physiol 221: 1156 - 63

84. Goodman MN, Parrilla R, Toews CJ. (1973)
Am J Physiol 225: 1384 - 8

85. Boyer JL, Klatskin G. (1970)
Gastroenterology 59: 853 - 9

86. Brauer RW, Leong GF, Holloway RJ. (1954)
Am J Physiol 177: 103 - 12

87. Schanker LS, Hogben AM. (1961)
Am J Physiol 200: 1087 - 90

88. Layden TJ, Starr J. (1978)
The American Association for the Study of Liver Diseases, 29th Annual Meeting, November 1978 : 973 (Abstr.)

89. Baker AL, Wood RAB, Moossa AR, Boyer JL. (1979)
J Clin Invest 64: 312 - 20

90. Strasberg SM, Kay RM, Ilson RG, et al. (1979)
Can J Physiol Pharmacol 57: 1138 - 47

91. Layden TJ, Boyer JL.(1977)
Gastroenterology 73: 120 - 8

92. Bajwa RS, Fujimoto JM. (1981)
Fed Proc 40: 607 (Abstr.)

L E B E N S L A U F

Am 17. Juni 1952 wurde ich in Stuttgart als Sohn des Mechanikermeisters Walter Jäschke und seiner Ehefrau Ruth, geb. Heß, geboren.

Von 1959 - 1964 besuchte ich die Volksschule in Stuttgart, Homburg/Saar und Breitenstein/Krs. Böblingen, danach die Realschule in Holzgerlingen/Krs. Böblingen und Sindelfingen, die ich im Juni 1969 mit der Mittleren Reife abschloß. Nachdem ich bei IBM in Sindelfingen ein 18-monatiges Praktikum der Nachrichtentechnik absolvierte, besuchte ich ab März 1971 die Technische Oberschule in Stuttgart, wo ich im Juli 1973 die fachgebundene Hochschulreife erlangte.

Nach einer zweijährigen Bundeswehrzeit (bis Juni 1975) in Böblingen und Porz-Wahn (Köln) begann ich im Wintersemester 1975/76 mit dem Studium der Biochemie an der Universität in Tübingen und legte bis März 1978 den zweiten Teil des Vordiploms ab. Nach den mündlichen Diplomhauptprüfungen (Juli 1980) arbeitete ich von September 1980 bis Mai 1981 an meiner Diplomarbeit:
"Glutathion in der Mäuseleber: Aufnahme und Wirkung"
unter Anleitung von Prof. Dr. A. Wendel am Institut für Physiologische Chemie. Die vorliegende Dissertation
"Ist die Östrogen-Cholestase Folge einer erhöhten Permeabilität des parazellulären Weges? Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber"
wurde von August 1981 bis Juni 1983 unter Anleitung von Prof. Dr. E. Pfaff am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen angefertigt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie:	G. Weitzel, D. Mecke, A. Wendel
Organische Chemie:	E. Bayer, M. Hanack
Anorganische Chemie:	E. Lindner, J. Strähle
Physikalische Chemie:	H. Mauser, W. Zeil
Anatomie:	K. Reutter, M.Arnold
Physik:	F. Gönnenwein
Botanik:	H. Metzner
Zoologie:	K.G. Grell
Mathematik:	H. Pommer
Mikrobiologie:	V. Braun, H. Zähner
Pharmakologie:	M. Siess, U. Breyer-Pfaff
Toxikologie:	H. Remmer, E. Pfaff
Physiologie:	E. Betz
Histologie:	K. Reutter